

Aus dem Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Neuroprotektives Potential der kalorienrest- riktiv-induzierten Hochregulation von FGF21 in der ApoE-Knockout-Maus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Medizinische Fakultät
der Universität Rostock

Rostock, 2018

vorgelegt von:

Tjark Eric Wölk

aus Rostock

geboren am 17.11.1991 in Kiel

Gutachter:

1. PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla

Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie – Universitätsmedizin Rostock

2. Prof. Dr. med. Andreas Wree

Institut für Anatomie – Universitätsmedizin Rostock

3. Prof. Dr. med. Agnes Flöel

Klinik und Poliklinik für Neurologie – Universitätsmedizin Greifswald

Datum der Einreichung: 16.06.2017

Datum der Verteidigung: 30.01.2018

Datum der Promotion: 19.02.2018

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung.....	1
1.1 Metabolisches Syndrom.....	1
1.2 Demenz	3
1.3 Alzheimer Demenz (AD)	4
1.3.1 Hypothesen zur Pathogenese der AD	4
1.3.2 Risikofaktoren	6
1.3.3 Funktion und Polymorphismus von ApoE	7
1.3.4 ApoE und AD	8
1.3.5 Therapiekonzepte der AD	9
1.4 FGF21.....	11
1.5 Fasten und Hibernation.....	12
1.6 Hypothese	15
2 Material und Methodik.....	16
2.1 ApoE(-/-)-Maus	16
2.2 Studiendesign	17
2.3 Kalorienrestriktion	17
2.4 Morris Water Maze.....	18
2.5 Organentnahme	19
2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	19
2.7 Genexpressionsanalytik	20
2.7.1 Isolierung.....	20
2.7.2 Photometrische Quantifizierung	20
2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese	21
2.7.4 cDNA-Herstellung	21
2.7.5 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR).....	22
2.7.6 Relative Quantifizierung der Genexpression.....	23

2.8	Proteinanalytik	24
2.8.1	Proteinisolierung	24
2.8.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	25
2.8.3	SDS-PAGE.....	25
2.8.4	Semidry-Western-Blot	27
2.8.5	Immundetektion	28
2.8.6	Zweitdetektion.....	29
2.8.7	Densitometrische Quantifizierung	30
2.9	Immunhistologie.....	30
2.10	Statistik.....	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Phänotyp und Verhalten der Mäuse	31
3.2	Gewichtsverlauf	31
3.3	Neuronale Genexpression lipolytischer Parameter.....	32
3.3.1	Neuronale PPAR γ -Genexpression	32
3.3.2	Neuronale ABCA1-Genexpression	33
3.4	FGF21 in Leber, Blut und ZNS	34
3.4.1	Hepatische FGF21-Genexpression	34
3.4.2	Systemische FGF21-Konzentration im Plasma	35
3.4.3	Neuronale Akkumulation von FGF21	36
3.5	Neuronale Aktivität von FGFR1c, ERK1/2 und AMPK	37
3.5.1	Expression von pFGFR1c.....	37
3.5.2	Expression von pERK1/2	38
3.5.3	Expression von pAMPK.....	39
3.6	Neuronale Akkumulation von pmTOR und pTau.....	40
3.6.1	Expression von pmTOR	40
3.6.2	Akkumulation von pTau	41
3.7	Expression vom PSD-95	42

3.8	Morris Water Maze.....	44
3.8.1	Zeit bis zur Entdeckung der Zielplattform	44
3.8.2	Plattform-Querungen am Testtag	46
4	Diskussion	48
4.1	Diskussion des Tiermodells	48
4.2	Pathologie einer neurodegenerativen Erkrankung	49
4.3	Auswirkungen der CR	50
4.4	Schlussfolgerung.....	55
5	Zusammenfassung	57
6	Anhang	58
6.1	Literaturverzeichnis	58
6.2	Thesen	70
6.3	Tabellarischer Lebenslauf	71
6.4	Selbstständigkeitserklärung	72
6.5	Danksagung	73

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit, Alter >19 Jahre, Einteilung nach Geschlecht und Industrie-/ Entwicklungsland, Ng et al. 2014 (9).....	2
Abb. 2 Ätiologie der Demenz, Neurologie - Endspurt Klinik, Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2013 (14).....	3
Abb. 3 Prävalenz von Demenzerkrankungen in Abhängigkeit vom Alter, EuroCoDe = European Collaboration on Dementia, Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 2014 (24)	6
Abb. 4 Zusammenhang zwischen A β -Peptidplaques im Gehirn und LDL-Cholesterol (links) bzw. Serumcholesterol (rechts), Kuo et al. 1998 (27)	7
Abb. 5 Stadien- und symptomgerechter Einsatz von Antidementiva und Psychopharmaka bei Patienten mit AD, Schweiger 2008 (5)	10
Abb. 6 Immunhistochemische Detektion von phosphoryliertem Tau, die Pfeile zeigen die besonders starke Reaktion am entorhinalen Kortex, Arendt et al. 2003 (71)	13
Abb. 7 FGF21 mRNA-Expression (links) und Serumkonzentration (rechts) vor, nach und während der Hibernation, Nelson et al. 2013 (72).....	14
Abb. 8 Hypothetischer FGF21-Pathway nach Kalorienrestriktion (links) und mögliche neurodegenerative Auswirkung eines Metabolischen Syndroms (rechts)	15
Abb. 9 Relative hepatische FGF21-mRNA-Expression von ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (Wildtyp=wt) im Alter von 4, 20 und 74 Wochen.....	16
Abb. 10 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Tierexperimente	17
Abb. 11 Abbildung des Beckens, Lynn Talton 2007	19
Abb. 12 Schematische Darstellung eines Semidry-Western-Blots	27
Abb. 13 Vergleich des Gewichtsverlaufes der ad libitum gefütterten Mäuse (AL) und die kalorienrestriktiv gefütterten Mäuse (CR) über 4 Wochen (A; AL: n=10, CR: n=10), über 20 Wochen (B; AL: n=10, CR: n=10) und über 65 Wochen (C; AL: n=7, CR: n=4); MW \pm SEM; ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p \leq 0,05 vs. AL.....	31

Abb. 14 ApoE-Knockout-Mäuse im Alter von 69 Wochen beim Absolvieren des Morris Water Maze; links nach ad libitum Fütterung (AL), rechts nach kalorienrestriktiver Fütterung (CR)	32
Abb. 15 RT-qPCR; Vergleich der relativen neuronalen mRNA-Expression von PPAR γ bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW \pm SEM; ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p \leq 0,05 vs. AL	33
Abb. 16 RT-qPCR; Vergleich der relativen neuronalen mRNA-Expression von ABCA1 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW \pm SEM	34
Abb. 17 RT-qPCR; Vergleich der relativen hepatischen mRNA-Expression von FGF21 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW \pm SEM, ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p \leq 0,05 vs. AL, #p \leq 0,05 vs. 4-Wochen-Tiere	35
Abb. 18 Sandwich-ELISA: Vergleich der FGF21-Konzentration im Plasma über 69 Lebenswochen bei ApoE-Knockout-Mäusen unter 65-wöchiger kontrollierter ad libitum Fütterung (AL: n=7) und Kalorienrestriktion (CR: n=4); MW \pm SEM, ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p \leq 0,05 vs. AL, #p \leq 0,05 vs. 8-wöchige Konzentration	36
Abb. 19 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Anwesenheit von FGF21 im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL = ad libitum Fütterung, CR = Kalorienrestriktion	37
Abb. 20 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von phosphoryliertem FGFR1c im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen	

(Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL = ad libitum Fütterung, CR = Kalorienrestriktion	38
Abb. 21 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pERK1/2 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM; ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL	39
Abb. 22 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pAMPK bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM	40
Abb. 23 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von phosphoryliertem mTOR im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL = ad libitum Fütterung, CR = Kalorienrestriktion	41
Abb. 24 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pTau bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); GAPDH diente als Ladekontrolle; MW±SEM; ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL; #p≤0,05 vs. 4-Wochen-Tiere	42
Abb. 25 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von PSD-95 im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit ad libitum Fütterung (A, C, E) und CR (B, D, F); AL = ad libitum Fütterung, CR = Kalorienrestriktion; A, B: 4-wöchige kontrollierte Fütterung, C, D: 20-wöchige kontrollierte Fütterung, E, F: 65-wöchige kontrollierte Fütterung	43

Abb. 26 Morris Water Maze: Vergleich der Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform 4 (PF ₄) bei ApoE-Knockout-Mäusen unter ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); die Abszisse beschreibt 5 Durchführungen des Parcours über 4 Versuchstage (an Tag 2 und 3 ist jeweils nur der letzte Durchlauf der Trainingsblöcke aufgeführt); A: kontrollierte Fütterung über 4 Wochen (AL 4w: n= 10, CR 4w: n=10), B: kontrollierte Fütterung über 20 Wochen (AL 20w: n=10, CR 20w: n=10), C: kontrollierte Fütterung über 65 Wochen (AL 65w: n=7, CR 65w: n=4); MW±SEM	45
Abb. 27 Morris Water Maze: Vergleich der Anzahl von jeweiligen Plattform-Überkreuzungen der ApoE-Knockout-Mäuse nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); A: kontrollierte Fütterung über 4 Wochen (AL 4w: n= 10, CR 4w: n=10), B: kontrollierte Fütterung über 20 Wochen (AL 20w: n=10, CR 20w: n=10), C: kontrollierte Fütterung über 65 Wochen (AL 65w: n=7, CR 65w: n=4); PF ₄ =Plattform im Zielquadranten (Quadrant 4), PF ₃ =Plattform in der Mitte des dritten Quadranten, PF ₂ =Plattform in der Mitte des zweiten Quadranten, PF ₁ =Plattform in der Mitte des ersten Quadranten; MW±SEM; ANOVA gefolgt von gepaartem Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL	46
Abb. 28 FGF21-Pathway nach Kalorienrestriktion	55

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Bestandteile des 1%igen Agarosegels	21
Tab. 2 Bestandteile des TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	21
Tab. 3 Zusammensetzung des Ladepuffers.....	21
Tab. 4 Zusammensetzung des Denaturierungsansatzes	22
Tab. 5 Bestandteile des RT-Mastermix-Ansatzes.....	22
Tab. 6 Bestandteile der RT-qPCR Mastermixe	22
Tab. 7 Primer für die RT-qPCR; das ribosomale Protein 18 S-Gen (RPS 18) diene hier als Housekeeping-Gen.....	23
Tab. 8 Temperaturprofil des Lightcyclers®	23
Tab. 9 Bestandteile des Lysispuffers.....	24
Tab. 10 SDS-Mini-Gel-Ansatz (Dicke 1,5 mm)	26
Tab. 11 Zusammensetzung 2x Protein-Probenpuffer.....	26
Tab. 12 Bestandteile des Elektronenpuffers (pH 8,3)	26
Tab. 13 Zusammensetzung der Transferpuffer	27
Tab. 14 Zusammensetzung des 1x TBST.....	28
Tab. 15 Zusammensetzung vom 1x TBS	28
Tab. 16 Primärantikörper (Cell Signaling®).....	28
Tab. 17 Sekundärantikörper (Cell Signaling®).....	29
Tab. 18 Zusammensetzung der Strip-Lösung	29
Tab. 19 Primärantikörper der immunhistochemischen Untersuchung	30

Abkürzungsverzeichnis

ABCA1.....	ATP-binding Cassette Transporter A1
AChE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimer Demenz
ADAS	Alzheimer's Disease Assessment Scale
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
AL.....	Ad Libitum
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid-Precursor-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BHS.....	Blut-Hirn-Schranke
BMI.....	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CR	Caloric Restriction
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FGF.....	Fibroblast Growth Factor
FGFR	FGF-Rezeptor
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT1.....	Glucose-Transporter-1
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase-3 β
HMGCS2	3-Hydroxy-3-MethylGlutaryl-CoA Synthase 2
HRP	Meerrettichperoxidase
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Version 10
IDF.....	International Diabetes Federation
IFN	Interferon
IL	Interleukin
KD	ketogene Diät
MAPK	Mitogen-aktivierte Kinase
MMST	Mini-Mental-Status-Test
mTOR.....	mammalian Target Of Rapamycin

MWM	<i>Morris-Water-Maze</i>
NCEP-ATP-III.....	<i>National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III</i>
NFTs.....	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NF- κ B.....	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
PCR	<i>Polymerasekettenreaktion</i>
PF	<i>Plattform</i>
PHFs.....	<i>Paired Helical Filaments</i>
PPAR.....	<i>Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor</i>
PS1/2.....	<i>Presenilin-1/-2</i>
PSD-95.....	<i>Postsynaptic Density Protein 95</i>
PVDF.....	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
ROS.....	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
RT.....	<i>reverse Transkriptase</i>
SDS-PAGE.....	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIRT.....	<i>Sirtuin</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRIS.....	<i>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS.....	<i>zentrales Nervensystem</i>

1 Einleitung

Die Relevanz neurodegenerativer Erkrankungen ist in der modernen Welt unumstritten. Die weltweiten Kosten beliefen sich 2015 auf 818 Milliarden US\$ und befinden sich im Aufwärtstrend (1). Aufgrund der weltweit weiter steigenden Prävalenzen konzentrieren sich Forschungsbemühungen verstärkt auf dieses Thema (2; 3). Obwohl die mediale Aufmerksamkeit groß ist und auch der Kontakt von Privatpersonen zu Fällen neurodegenerativer Krankheiten nichts Außergewöhnliches darstellt, ist die genaue Ätiologie zum Teil nicht vollständig geklärt (4). Dementsprechend geraten sowohl die Schul- als auch die Alternativmedizin bisher an ihre therapeutischen Grenzen (5). Der bekannteste und häufigste Vertreter der Demenzerkrankungen, Morbus Alzheimer, ist einer dieser Fälle (4). Diese Studie reiht sich in den bestehenden Forschungskontext ein, dessen ultimates Ziel eine präzisere und umfassendere Beschreibung der Ätiopathogenese dementieller Erkrankungen ist. Zahlreiche Studien beurteilen in diesem Zusammenhang neuronale Einflüsse und Effekte von am Stoffwechsel beteiligten Metaboliten und Produkten. Ferner legt die ebenfalls simultan steigende Prävalenz von Adipositas und des damit verbundenen Metabolischen Syndroms die Verknüpfung beider Bereiche nahe (6). Der Körper bleibt ein Organismus diverser sich beeinflussender Funktionseinheiten und ist keine Zusammensetzung gegenseitig unabhängiger Organe. Konsequenterweise ist es unumgänglich, in jeglicher Hinsicht die Gesamtheit der Systeme zu betrachten.

1.1 Metabolisches Syndrom

Das Metabolische Syndrom beschreibt das Zusammentreffen mehrerer sich tangierender Stoffwechselerkrankungen. Es wird durch vier Risikofaktoren charakterisiert: viszerale Adipositas, Dyslipoproteinämie (Triglyceride ↑, HDL-Cholesterol ↓), essenzielle Hypertonie und Glucosetoleranzstörung bzw. Typ-2-Diabetes. Die aus der genannten Insulinresistenz resultierende Hyperinsulinämie forciert einerseits durch ein erhöhtes Hungergefühl die Adipositas, andererseits führt es zu einem erhöhten Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses infolge vorzeitiger Arteriosklerose (7). Das „tödliche Quartett“, wie es 1989 Kaplan (8) beschrieb, begünstigt ebenfalls die Ausbildung einer hepatischen Steatose, die anschließend über Fibrosierungsprozesse bis zum hepatozellulären Karzinom führen kann.

Wenngleich eine exakte, ubiquitär geltende Definition derzeit nicht existiert, haben sich dennoch gewisse Kriterien zur Diagnosestellung durchgesetzt. Hierbei handelt es sich um Richtlinien der WHO (World Health Organization), der IDF (International Diabetes Federation) und des NCEP-ATP-III (National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III), die sich an oben genannten Risikofaktoren orientieren.

Die Zunahme erkrankter Patienten in den Industrienationen erklärt sich aus der steigenden Fehlernährung bei gleichzeitigem Bewegungsmangel mit resultierendem Übergewicht (Abb. 1), weshalb sich auch die Bezeichnung „Wohlstandssyndrom“ entwickelte.

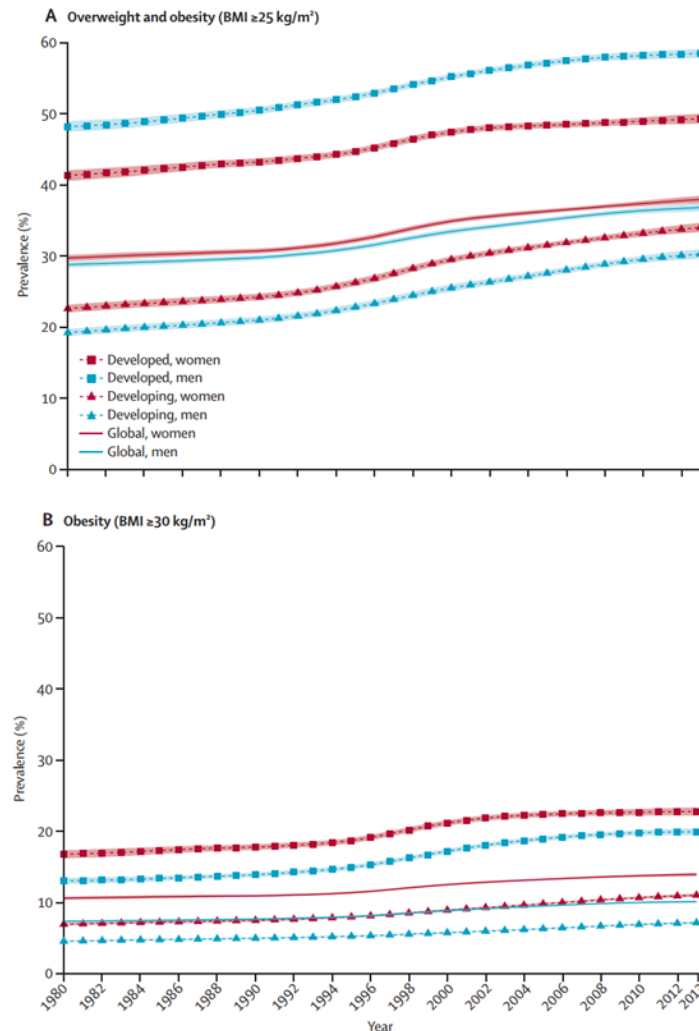


Abb. 1 Prävalenz von Übergewicht und Fettleibigkeit, Alter >19 Jahre, Einteilung nach Geschlecht und Industrie-/Entwicklungsland, Ng et al. 2014 (9)

Neben den Begleiterkrankungen des Metabolischen Syndroms wie der hepatischen Steatose, dem Typ-2-Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen infolge der entgleisten Stoffwechsellage und der Hypertonie, besteht auch ein Zusammenhang zur Anfälligkeit für kognitive Störungen. So zeigten Xu et al. 2011, dass sich das Risiko an einer Demenz zu erkranken bei einem BMI (Body-Mass-Index) zwischen 25 und 30 um 71% erhöht, während es sich bei einem BMI über 30 bereits vervierfacht (10). Auch Singh-Manoux et al. beschrieben in ihrer Studie aus dem Jahr 2012 eine positive Korrelation zwischen Adipositas bzw. einer krankhaften Stoffwechsellage und einer beschleunigten kognitiven Verschlechterung über 10 Jahre (11). Personen, bei denen beides vorlag, schnitten bei Kognitionstests, welche logisches Denken, Gedächtnis und Sprachkompetenz analysierten, am schlechtesten

ab. Ein Erklärungsansatz hierfür ist der erhöhte oxidative Stress. Sowohl das Alter als auch die Akkumulation von Triglyceriden und Cholesterin führen zu einer vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Nach Herrup et al. (12) und Smith et al. (13) bewirken diese eine Fortschreitung neurodegenerativer Erkrankungen, beispielsweise einer Demenz.

1.2 Demenz

Unter einer Demenz versteht man einen Abbau intellektueller und kognitiver Fähigkeiten infolge einer progredienten Atrophie des kortikalem/subkortikalem Hirnparenchyms. Nach ICD-10 Kriterien ist für die Diagnosestellung eine sechsmonatige Persistenz dreier Kriterien von Bedeutung: eine Gedächtnisstörung, Beeinträchtigung mindestens einer weiteren kognitiven Funktion (bspw. Sprache, Willkürmotorik, Objekterkennung, usw.) und Einschränkungen im Alltag und/oder Beruf. Da viele Areale des zentralen Nervensystems betroffen sein können, kann sich die Symptomatik sehr heterogen äußern. So sind Persönlichkeitsveränderungen, Orientierungsstörungen, Denkstörungen, extrapyramidal-motorische Störungen und andere Beschwerden möglich (14).

Grundsätzlich ist die Ätiologie – wie in Abbildung 2 zu erkennen – sehr vielseitig.

Erkrankungsgruppe	Erkrankungen
neurodegenerative Erkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Alzheimer-Demenz ▪ Lewy-Body-Demenz ▪ Morbus Pick (frontotemporale Demenz) ▪ Parkinson-Demenz ▪ Chorea Huntington
Erkrankungen mit diffuser und multilokulärer Hirnschädigung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ vaskuläre Demenz ▪ zerebrale Raumforderungen ▪ Normaldruckhydrozephalus ▪ Multiple Sklerose ▪ Schädel-Hirn-Trauma (Dementia pugilistica) ▪ infektiöse Erkrankungen: AIDS-Demenz, Demenz bei Lues (Dementia paralytica), Creutzfeld-Jakob-Krankheit
Stoffwechsel- und endokrine Störungen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vitaminmangelerkrankungen (v. a. Vitamin-B₁₂-Mangel) ▪ Hypothyreose ▪ metabolische Enzephalopathie (urämisches, Leberinsuffizienz)
Intoxikationsfolgen	Alkohol, Lösungsmittel, CO, Schwermetalle

Abb. 2 Ätiologie der Demenz, Neurologie - Endspurt Klinik, Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2013 (14)

Während bei jüngeren Personen die AIDS-Demenz eine große Rolle spielt, erkranken ältere Personen am häufigsten an vaskulärer Demenz und der Alzheimer Demenz (AD), welche in der Bevölkerung am bekanntesten ist. Neben der Einteilung nach der Ätiologie, kann man eine Demenz auch nach der Hauptlokalisation der Atrophie im zentralen Nervensystem (ZNS) charakterisieren. Je nach Fokus unterscheiden sich dann deren Leitsymptome: Bei einer frontotemporalen Demenz (Morbus Pick) kommt es vorrangig zu Persönlichkeitsveränderungen, eine subkortikale Demenz (Morbus Binswanger) äußert sich vor allem durch Verlangsamung und Aufmerksamkeits-/Affektstörungen und die kortikale Demenz (Morbus Alzheimer) zeichnet sich durch Gedächtnisstörungen aus. Im Allgemeinen ist der Beginn schleichend mit langsam progredienter Verschlechterung, weshalb die Erkrankung lange Zeit (oft auch durch den Versuch des Patienten, die Defizite zu verbergen) übersehen werden kann (14).

Auch wenn sich das Gebiet um das dementielle Syndrom eines großen Interesses in der Forschung erfreut, ist eine kausale Therapie zum jetzigen Zeitpunkt bei circa 90% der Patienten nicht möglich. Primäres Ziel einer Therapie ist demnach der möglichst lange Erhalt der Selbstständigkeit. Eine Kombination aus medikamentösen, psychotherapeutischen (z.B. Körperkontakt, mehrfaches Zusammenfassen des Besprochenen) und soziotherapeutischen (z.B. Vereinfachung von Tagesabläufen) Maßnahmen besitzt momentan das beste Outcome (15).

1.3 Alzheimer Demenz (AD)

Der Morbus Alzheimer ist mit etwa 65% die häufigste Form aller Demenzen in Deutschland (16). Die Deutsche Alzheimer Gesellschaft schätzte die Krankheitszahl 2010 auf etwa 1,5 Millionen. Mit dem Alter steigt die Prävalenz der Erkrankung, weshalb sich durch die stetig alternde Bevölkerung auch die AD zu einem großen Problem entwickelt. Aus diesem Grund rechnet man bis 2050 mit einer Verdopplung der Anzahl an Betroffenen. Auch wenn die Krankheit bereits 1906 von Alois Alzheimer beschrieben wurde, ist aufgrund eingeschränkter Behandlungsmöglichkeiten bei hohem Leidensdruck der Erkrankten (inklusive Angehöriger) der Entwicklungsbedarf hoch. Man unterscheidet die familiär gehäufte, präsenile Form der AD (early-onset, 5%), welche meist unter dem 65. Lebensjahr mit rascher Progredienz auftritt von der sporadischen, senilen AD (late-onset, 95%), die meist ab dem 65. Lebensjahr mit langsamer Progredienz vorkommt.

1.3.1 Hypothesen zur Pathogenese der AD

Die genaue Ätiopathogenese ist gegenwärtig nicht vollständig geklärt. Dem heutigen Kenntnisstand zufolge spielen sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren bei der Neurodegeneration eine Rolle. Dieser multifaktorielle Ursprung erschwert zusätzlich das Finden einer adäquaten und effektiven Therapie.

Bekannt ist eine Pathologie bezüglich des Mikrotubuli-assoziierten Tau-Proteins. Dieses unterstützt und stabilisiert den Zusammenbau von Mikrotubuli, in dessen Folge unter anderem der axonale Transport und das Neuritenwachstum ermöglicht wird (17). Die Aktivität wird durch Kinase-abhängige Phosphorylierung reguliert. Kommt es nun zu einer pathologischen Überphosphorylierung von Tau, werden die Funktion und die Bindung an die Mikrotubuli eingeschränkt oder komplett inaktiviert. Dadurch resultieren sowohl Störungen des Zytoskeletts als auch eine Aggregation hyperphosphorylierter Tau-Proteine, die sich als gepaart-helikale neurofibrilläre Bündel (Neurofibrillary Tangles = NFTs) darstellen und toxisch wirken (18). Inwiefern diese Ablagerungen als krankheitsauslösend eingestuft werden können, ist noch nicht vollends geklärt. Möglich ist auch, dass es erst als Folge der primären Krankheit auftritt.

Weiterhin typisch für das Krankheitsbild ist, dass es zu einer vermehrten Bildung von A β -Peptidplaques (sog. senile Plaques) kommt. Diese sind extrazelluläre Peptid-Ablagerungen und entstehen zu einem großen Teil durch die proteolytische Spaltung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), ein ubiquitär vorkommendes, integrales Membranprotein mit vielseitiger Funktion, unter anderem notwendig für die Bildung von Synapsen (19). Neben der nicht-amyloidogenen Spaltung mit physiologischem Nutzen für den Erhalt der Nervenzelle entstehen bei der pathologischen (amyloidogenen) Spaltung durch bestimmte Sekretasen Fragmente mit hohem Potential zur Aggregation und Ablagerung (20).

Beide Elemente könnten zu einem fortschreitenden Verlust von Nervenzellen, einer Axondegeneration und somit zu einem Verlust von kortikaler Hirnsubstanz führen. Die vorhandenen inflammatorischen Prozesse mögen zusätzlich bedeutend für die Ursache der Neurodegeneration sein, sind aber auch als Folge dieser denkbar. Resultierend aus den Atrophien und Degenerationen cholinergischer Neuronen (v.a. Nucleus basalis Meynert und cholinerge Axone im Cortex) entsteht ein cholinerges Defizit, was als wichtiger Faktor für die Symptomatik verantwortlich gemacht wird. Ebenfalls scheint eine pathologisch hohe Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt eine wichtige Rolle als Initiator der Symptomatik zu spielen (14). Des Weiteren werden Zusammenhänge zu vaskulären Störungen beschrieben, welche durch arteriosklerotische, inflammatorische und amyloidogene Degenerationen ausgelöst werden. Als Folge kommt es zu einer erhöhten Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen (21). Nicht zuletzt ist bei der AD ein Wiedereintritt von ausdifferenzierten Neuronen in den Zellzyklus bekannt. Genaue Mechanismen werden diesbezüglich noch diskutiert (22).

Paraklinisch lassen sich durch bildgebende Verfahren die Atrophien zum Vorschein bringen. Eine sichere Diagnose ist jedoch nur neuropathologisch post mortem möglich.

1.3.2 Risikofaktoren

Sowohl genetische als auch exogene Einflüsse werden bei der Pathogenese der AD diskutiert. Genetisch konnte eine Beteiligung mehrerer Faktoren nachgewiesen werden. Eine Mutation im APP-Gen führt durch Überexpression von APP zu einer Verstärkung der amyloidogenen Prozessierung bei der hereditären Form der Erkrankung. Das Gen liegt auf dem 21. Chromosom. Das 3-fache Vorhandensein des Locus bei einer Trisomie-21 (Down-Syndrom) könnte das frühe Eintreten der AD bei Betroffenen erklären. Weitere Faktoren, die bei der frühen Form der AD eine Rolle spielen sind die Presenilin-1/-2(PS1/2)-Gene, dessen transkribierte Proteine unter anderem Bestandteile der Sekretasen für die amyloidogene Spaltung und beteiligt an der Prozessierung von Transmembranproteinen sind. Eine Veränderung der Proteine (vor allem PS1) verschiebt das Spaltungsverhältnis zugunsten der Fragmente mit erhöhter Aggregationstendenz. Des Weiteren wird ein möglicher Zusammenhang zwischen genetischer NMDA-Rezeptor Dysfunktion und der late-onset-AD diskutiert (23).

Exogene Risikofaktoren finden sich vor allem bei der sporadischen Form des Morbus Alzheimer. Der wichtigste ist hierbei das Alter. Auffällig ist nämlich, dass die Prävalenz mit Zunahme des Alters überproportional steigt (24), wie Abbildung 3 zeigt.

Altersgruppe	Mittlere Prävalenzrate nach EuroCoDe (%)			Geschätzte Zahl Demenzkranker in Deutschland Ende des Jahres 2014		
	Männer	Frauen	Insgesamt	Männer	Frauen	Insgesamt
65-69	1,79	1,43	1,60	34.500	29.800	64.300
70-74	3,23	3,74	3,50	66.500	88.500	155.000
75-79	6,89	7,63	7,31	124.800	175.300	300.100
80-84	14,35	16,39	15,60	137.000	236.300	373.300
85-89	20,85	28,35	26,11	100.000	277.400	377.400
90 und älter	29,18	44,17	40,95	44.200	237.500	281.700
65 und älter	6,87	10,77	9,08	507.000	1.044.800	1.551.800

Abb. 3 Prävalenz von Demenzerkrankungen in Abhängigkeit vom Alter, EuroCoDe = European Collaboration on Dementia, Deutsche Alzheimer Gesellschaft, 2016 (24)

Die Tatsache, dass circa 70% der Erkrankten weiblich sind, erklärt man sich nicht nur aus der erhöhten Lebenserwartung. Spekulativ könnte die Reduzierung des protektiven Östrogens im Senium von Bedeutung sein (25).

Wie bereits erwähnt, zählt ebenso das Metabolische Syndrom mit dem zusammenhängenden oxidativen Stress als Risikofaktor. Es ist bekannt, dass im Gehirn von Alzheimer-Patienten die oxidative Stress-assoziierte Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) mit dem Nachweis intrazellulärer AGE-Ablagerungen gehäuft auftritt (26). Auch durch eine erhöhte Glykierung bei diabetogener Stoffwechsellaage mit Hypertriglyceridämie und Hyperglycämie können AGEs entstehen. Wei-

terhin beobachteten Kuo et al. 1998 eine positive Korrelation zwischen A β -Peptidplaques und der Menge an Cholesterol im Blut (Abb. 4) (27).

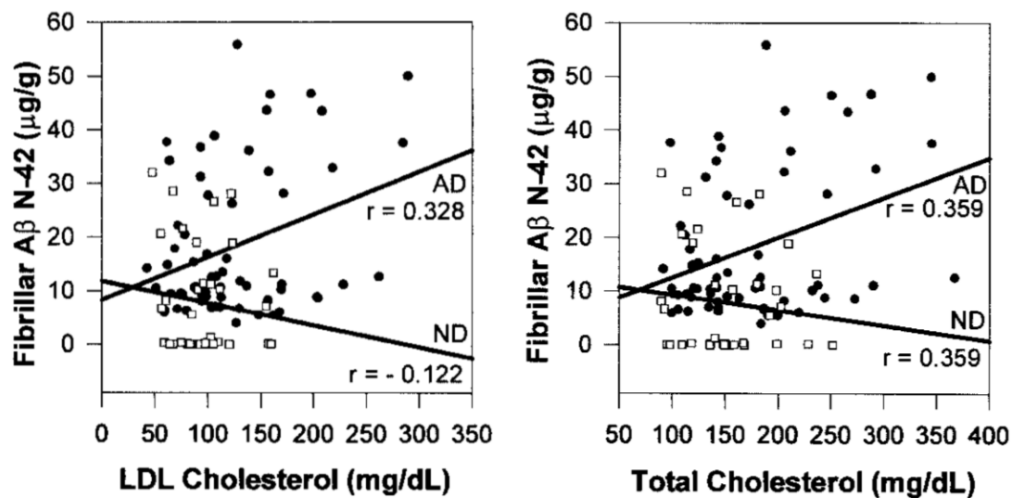


Abb. 4 Zusammenhang zwischen A β -Peptidplaques im Gehirn und LDL-Cholesterol (links) bzw. Serumcholesterol (rechts), Kuo et al. 1998 (27)

Refolo et al. konnten darüber hinaus 2000 und 2001 zeigen, dass die Plaqueformationen in transgenen Mäusen durch eine High-Fat-Diet zunehmen (28), während die Bildung von A β -Peptidplaques unter Cholesterolsenkenden Medikamenten abnahm (29). Somit besteht der Grund zur Annahme einer noch nicht endgültig erforschten Verknüpfung zwischen Stoffwechsel und Demenz, welche aber eine potente Möglichkeit der Therapie der Erkrankung offenbaren kann.

Alternative in der Fachliteratur kontrovers diskutierte Risiken sind unter anderem Schädel-Hirn-Traumata, sozioökonomischer Status in Verbindung mit dem Bildungsniveau, Infektionen und ZNS-Entzündungen.

Weiterhin existiert ein zusätzlicher metabolischer Risikofaktor. Dieser hängt mit dem Apolipoprotein E (ApoE) zusammen. Für die late-onset AD ist das Vorliegen des ϵ_4 -Allels von großer Bedeutung. Dies erhöht das Risiko um das 2- bis 10-Fache, an der sporadischen Form der AD zu erkranken (14). Außerdem wird selbigem Allel ebenfalls eine Beteiligung an der familiären Form nachgesagt (30). Um dabei die weitgreifenden Zusammenhänge zu verstehen, benötigt es einen tieferen Einblick in die Funktion und den Polymorphismus des ApoE.

1.3.3 Funktion und Polymorphismus von ApoE

ApoE spielt als Bestandteil bestimmter Lipoproteine unter anderem im Lipid-Transport und damit im gesamten Fettstoffwechsel des Menschen eine entscheidende Rolle (31). Hauptexpressionsorte sind Leber und Gehirn (32). Als regulatorische Faktoren der Transkription gelten die nukleären Re-

zeptoren PPAR (Peroxisom-Proliferator-Aktivator-Rezeptor) α und γ (PPAR α wird vorwiegend in Leber/Niere/Darm/Herz exprimiert, PPAR γ ubiquitär) (33). Diese setzen unter anderem lipolytische Prozesse in Gang (34).

Beim Menschen zeigt ApoE einen ausgeprägten Polymorphismus. Drei wichtige Isoformen sind ϵ_2 , ϵ_3 und ϵ_4 . Der Genotyp Apo ϵ_3/ϵ_3 ist mit etwa 63% im europäischen Raum am häufigsten, gefolgt von Apo ϵ_4/ϵ_3 (ca. 15%). Apo ϵ_2/ϵ_2 (ca. 1%) kann bei Vorliegen weiterer genetischer Defekte bzw. ungünstiger Umweltfaktoren zur Ausbildung einer Hyperlipoproteinämie Typ III (nach Fredrickson) führen. Träger des Apo ϵ_4 -Polymorphismus haben eine erhöhte LDL-Cholesterinkonzentration, ein resultierendes erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und, wie bereits beschrieben, ein größeres Risiko an der sporadischen Form des Morbus Alzheimer zu erkranken (35). Nun kann man zwei Annahmen aufstellen: Entweder führt der Apo ϵ_4 -Polymorphismus zu einer Ausbildung degenerativer Vorgänge im ZNS oder die ApoE-vermittelten neuroprotektiven Prozesse sind durch eine Dysfunktion vom Apo ϵ_4 -Allel nicht mehr gewährleistet. Durchaus denkbar ist auch eine Mischung aus beidem (36).

1.3.4 ApoE und AD

Auf neuronaler Ebene synthetisieren Mikroglia und Astrozyten ApoE. Nach der Entstehung wird ApoE über den ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) aus der Mikroglia/dem Astrozyten ausgeschleust (37). Durch diese unterstützende Rolle wird auch ABCA1 eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben (38). Im Extrazellularraum scheint ApoE bei der synaptischen Plastizität und kognitiven Vorgängen eine Rolle zu spielen. Bekannt ist, dass eine neuronale Verletzung die ApoE-Expression induziert, vermutlich aufgrund einer die Heilung unterstützende Wirkung (39). Andere Funktionen, wie den Einfluss auf Neuroinflammation werden zum jetzigen Zeitpunkt noch widersprüchlich diskutiert, da die genauen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt sind.

In Bezug auf die AD haben Studien einen weitreichenden Einfluss auf die pathogenen, aber auch protektiven Prozesse bei der Krankheitsentwicklung feststellen können. Masliah et al. beschrieben in ApoE-defizienten Mäusen deutlich erhöhte altersbedingte zytoskelettale und synaptische Veränderungen mit resultierenden neurodegenerativen Prozessen (40). In diesem Zusammenhang ist das Postsynaptic Density Protein 95 (PSD-95) von Bedeutung. Als essentieller Bestandteil der Postsynapse ist es ein Marker für synaptische Plastizität. So wurde herausgefunden, dass sowohl ApoE-Knockout-Mäuse als auch Mäuse mit der Isoform Apo ϵ_4 eine deutliche Defizienz an PSD-95 aufwiesen, was mit einer limitierten Ausbildung synaptischer Komplexe einherging (41).

Weiterhin ist ApoE in der Lage, die übermäßige Phosphorylierung von Tau-Proteinen zu unterbinden. Dies wird durch den Einfluss auf sowohl Tau-phosphorylierende Proteine wie GSK-3 β , P35 und

CDK5 als auch durch eine Hemmung der Tau-Kinase selbst ermöglicht. Es folgen weniger zytoskelettale Schädigungen und eine geringere Ablagerung von gepaart-helikalen neurofibrillären Bündeln. Neurodegenerative Prozesse könnten aufgehalten beziehungsweise konterminiert werden (42). Um den möglichen Vorgang der Reduktion von überphosphoryliertem Tau mittels ApoE etwas zu beleuchten, ist in diesem Zusammenhang wichtig, die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) zu erwähnen. Durch Phosphorylierung wird sie in den aktiven Zustand pAMPK überführt. AMPK spielt eine entscheidende Rolle bei der Energiehomöostase der Zelle durch Aktivierung wichtiger Enzyme des Fett- und Glucosestoffwechsels. Dadurch wird Energie bereitgestellt, weshalb AMPK auch physiologisch durch eine hohe AMP/ATP-Rate aktiviert wird (43). Es wird vermutet, dass pAMPK durch die Inhibition vom mammalian Target of Rapamycin (mTOR) bei der Reduzierung der Tau-Protein-Phosphorylierung maßgeblich beteiligt ist (44; 45; 46; 47). Darüber hinaus führt die Reduktion von mTOR zu einer gesteigerten Expression des PSD-95 (45).

Aufgrund dieser Beziehungen zwischen Apolipoprotein E und der Pathogenese der AD, sehen viele Forschergruppen darin ein geeignetes Target für zukünftige Behandlungen.

1.3.5 Therapiekonzepte der AD

Bis heute ist die AD nicht heilbar. Ziel der Therapie ist daher, Progredienz zu verlangsamen, langer Erhalt der vorhandenen Fähigkeiten, möglichst langer Verbleib in vertrauter Umgebung und nicht zuletzt Verbesserung der Symptomatik (kognitiv und nicht-kognitiv). Es bedarf mehrerer Bestandteile eines Gesamttherapiekonzeptes, um dem Patienten adäquat helfen zu können. Dies betrifft sowohl die biologische als auch die psychologische und soziale Ebene. Es gilt, Aktivitäten zur Aufrechterhaltung und Förderung der geistigen und körperlichen Gesundheit zu finden. Von großer Wichtigkeit ist das Zusammenspiel zwischen Betroffenen, dem Therapeuten, Familienangehörigen und Pflegenden. Nicht zuletzt bleibt die medikamentöse Behandlung in Form von Antidementiva und Psychopharmaka ein fester therapeutischer Pfeiler (5). Abbildung 5 zeigt einen Überblick über die medikamentöse Behandlung der Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT). Diese ist stadienabhängig.

Unter Antidementiva versteht man Arzneimittel, welche kognitive Funktionen verbessern sollen und auf die Indikation des Morbus Alzheimer geprüft wurden. Eine anerkannte Wirkstoffklasse ist derzeit die der Acetylcholinesterase-Inhibitoren (AChE-Hemmer), wie zum Beispiel Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Mit ihrer Funktion, nämlich dem verlangsamten Abbau des Acetylcholins, wird versucht, die Konzentration im synaptischen Spalt zu erhöhen und dadurch die kognitiven Störungen aufzuhalten.

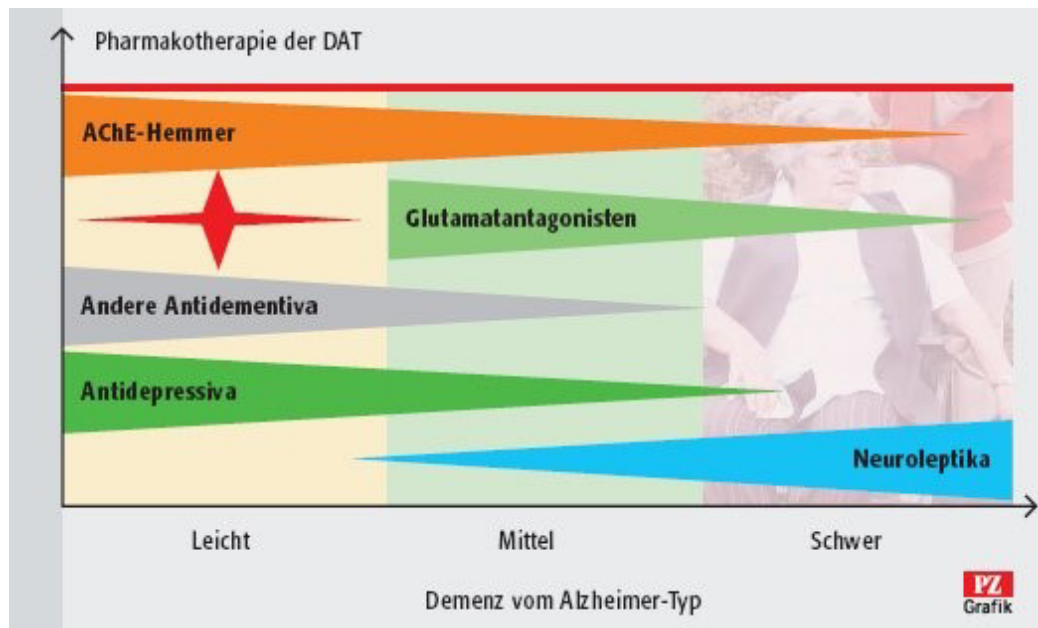


Abb. 5 Stadien- und symptomgerechter Einsatz von Antidementiva und Psychopharmaka bei Patienten mit AD, Schweiger 2008 (5)

Der zweite Therapieansatz bezieht sich auf den Glutamatüberschuss mit daraus folgender Überstimulierung der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren). Dadurch entsteht ein lang anhaltender Kalzium-Einstrom in die Nervenzelle, welcher diese schädigt und zerstören kann. Durch Antagonisierung (z.B. mit Memantin) kann man diesem Prozess vorbeugen und sowohl Kognition als auch Alltagskompetenzen verbessern. Neben den erwähnten Wirkstoffklassen existieren noch weitere, meist pflanzliche Präparate (sogenannte Nootropika), denen eine antidementive Wirkung zugeschrieben wird. Diese soll durch vasodilatatorische, antioxidative, antiinflammatorische und stoffwechselanregende Prozesse erreicht werden. Ein gesicherter Nachweis der Wirksamkeit existiert bei diesen Mitteln jedoch nicht. Daher ist der Einsatz umstritten (5). Die Therapieeffekte werden mit verschiedenen Tests erfasst. Hierzu gehören unter anderem der Mini-Mental-Status-Test (MMST) und die kognitive Subskala der Alzheimer's Disease Assessment Scale (ADAS-cog.).

Aufgrund der Tatsache, dass die AD kausal noch nicht zu behandeln ist, besteht in Anbetracht der großen Gruppe an Betroffenen sehr viel Interesse an der Erforschung neuer therapeutischer Ansätze und Targets. Beispiele hierfür sind: Butyrylcholinesterase-Inhibitoren, Sekretaseinhibitoren, Hemmung der Tau-Aggregation oder eine Immunisierung gegen A β -Peptide. Einen bahnbrechenden Erfolg konnte jedoch noch keine dieser Therapien vorweisen. Daher sind weitere Anstrengungen in der Grundlagenforschung zur Aufklärung genauer pathogenetischer Mechanismen vonnöten.

1.4 FGF21

In diesem Zusammenhang könnte der Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) eine entscheidende Rolle spielen. Er gehört zur Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, in der bisher 23 Mitglieder bekannt sind. Diese Signalproteine übernehmen regulatorische Funktionen, unter anderem in der Embryonalentwicklung, dem Zellüberleben, der Mitose und der Angiogenese (48). Hauptexpressionsorte sind die Leber und das Fettgewebe (49). Die Wirkung der Faktoren läuft über FGF-Rezeptoren (FGFR). Dies sind Tyrosinkinase-Rezeptoren, die durch Autophosphorylierung aktiviert werden und intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen. Thorns & Masliah entdeckten bereits 1999 bei FGFs Hinweise neuroprotektiver Eigenschaften. Sie fanden heraus, dass sie die Expression des NMDA-Rezeptors verringern und somit die für neurodegenerative Erkrankungen typische Überstimulation des NMDA-Rezeptors beschränken (50).

Das FGF21-Gen liegt auf dem 19. Chromosom. Das hieraus transkribierte Protein wurde als erstes 2000 von Nishimura et al. beschrieben. Der menschliche FGF21 besteht aus 209 Aminosäuren und besitzt eine hohe (~75%) Äquivalenz zum FGF21 in Mäusen (51).

Bekannt ist, dass die Expression von FGF21 durch die Aktivität der mitochondrialen 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 2 (HMGCS2) induziert wird, einem Enzym, welches für die Ketonkörperproduktion zuständig ist (52). FGF21 wird dabei sowohl autokrin als auch parakrin sezerniert (48). Als Besonderheit wird FGF21 darüber hinaus – für andere FGFs untypisch – hormonähnlich in den Blutkreislauf endokrin entlassen (53). Für die Aktivierung weiterer Kaskaden wird folgend nicht nur ein FGF-Rezeptor, sondern auch ein Co-Rezeptor in Form des Transmembranproteins β -Klotho benötigt. FGF21 bindet dabei bevorzugt an die Isoform FGFR1c (54).

Die vollständige Funktion des Wachstumsfaktors ist noch nicht abschließend geklärt. Mit der Zeit wurde ihm eine Rolle im Metabolismus des Körpers zugeschrieben. Unter anderem konnte herausgefunden werden, dass eine FGF21-Exposition auf Adipozyten zu einer erhöhten Expression vom Glucose-Transporter-1 (GLUT1) und damit zu einer erhöhten Glucoseaufnahme (insulinunabhängig) führt. Infolgedessen konnte nach oraler Glucosegabe in ob/ob (obese) und db/db (diabetes) Mäusen durch exogenes FGF21 eine Reduktion des maximalen Blutglucosespiegels und des maximalen Blutinsulinspiegels nachgewiesen werden (55; 56). Ferner ist FGF21 ein Regulator der Lipolyse und des LDL-Rezeptors, womit die Clearance von LDL einher geht (57; 58).

Positive Effekte wurden auch bei Zellfunktion und Zellüberleben festgestellt. Wentz et al. zeigten in β -Zellen im Pankreas, dass FGF21 die Extracellular-signal Regulated Kinase 1 und 2 (ERK1/2) und die Akt Signalkaskade aktiviert (59). Dadurch wurde eine Induktion der Insulinsynthese und eine Protektion gegen Zytokin-induzierte Apoptose sowie Glucolipotoxizität registriert (59).

Inwiefern sich das neuronal regulierte ERK, welches als Mitglied der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAPK) Familie unter anderem Zellproliferation und Zelldifferenzierung reguliert, auf die AD auswirkt, ist bisher nicht endgültig geklärt, da sowohl protektive als auch degenerative Prozesse hinsichtlich der AD beschrieben wurden. Jedoch existieren einige Belege, dass mithilfe dieser ERK1/2-Kaskade eine von FGF21 induzierte Aktivierung von AMPK stattfindet (59; 60; 61). AMPK führt wiederum zur oben beschriebenen Reduktion von mTOR, was somit die Tau-Phosphorylierung beeinflusst (61). Außerdem könnte die Verzögerung des Krankheitsverlaufes der AD ebenfalls durch die Stimulation der autophagischen Degradation dysfunktionaler Zellen hervorgerufen werden (46).

Voraussetzung für die Wirkung von endogen in der Leber synthetisiertem FGF21 auf neuronaler Ebene ist einerseits die Passage vom Blut ins ZNS. Dieser Thematik haben sich Hsueh et al. 2007 angenommen. Mithilfe radioaktiver Marker haben sie nachgewiesen, dass FGF21 die Blut-Hirnschranke (BHS) überwinden kann und daher das Potential besitzt, dort zu wirken (62). Andererseits benötigt es entsprechende Rezeptoren. Dabei wurde unter anderem von Bookout et al. herausgefunden, dass diese in Form von unter anderem FGFR1c umfassend im ZNS exprimiert werden (63). Doch wie lässt sich die endogene Synthese von FGF21 anregen?

1.5 Fasten und Hibernation

Bei der Anpassung des Körpers an Nahrungsumstellungen (z.B. Fasten oder Diät) sind viele Faktoren beteiligt, um die Energieversorgung optimal für jede Körperregion sicher zu stellen. Auch hier wird FGF21 ein maßgeblicher Einfluss zugeordnet. Badman et al. charakterisierten 2007 FGF21 als einen endokrinen Regulator der Ketose, also eines Stoffwechselzustandes mit erhöhter Konzentration an Ketonkörpern im Blut. Ursache für eine Ketose ist beispielsweise eine länger andauernde Hungerperiode bzw. ungenügende Kohlenhydratzufuhr. Daraus resultierend kommt es über die β -Oxidation zu vermehrtem Abbau von Fettsäuren zu Ketonkörpern, um den Energiebedarf zu decken. Aufgrund eines relativen Glucosemangels (wegen der gestörten Glucoseaufnahme in die Zellen) kann es bei Diabetes-Patienten ebenfalls zu einer vergleichbaren Stoffwechsellage kommen und zu einer Ketoazidose führen. Die Autoren konnten durch Fasten beziehungsweise durch eine ketogene Diät (KD), welche sich durch einen hohen Fettanteil und einen niedrigen Kohlenhydratanteil auszeichnet, in Mäusen reversibel eine erhöhte Konzentration von hepatischem und im Blut zirkulierendem FGF21 nachweisen. In weiteren Versuchen wurden bei Mäusen mit einem hepatischen FGF21-Knockdown nach einer KD eine Fettleber, eine Lipämie und eine Reduktion der Ketonkörperkonzentration im Blut festgestellt (64). In diesem Zuge zeigten auch Kuhla et al. signifikant erhöhte FGF21-Plasmaspiegel nach einer langandauernden Kalorienrestriktion (CR) um 40% (65). Daraus folgte durch die eingeleitete Lipolyse und Ketogenese ein signifikanter Anstieg von β -Hydroxybutyrat (65). Darüber hinaus wurden sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen mit Fettleibigkeit

gesteigerte FGF21-Serumkonzentrationen ermittelt, was die Hypothese nahelegt, dass Adipositas mit einer FGF21-Resistenz einhergehen könnte (66).

Erwiesenermaßen existiert zwischen der Ernährung und neuronalen Prozessen ein nicht unerheblicher Zusammenhang. Zahlreiche Forscher untersuchten diesen Umstand an Patienten mit neurologischen Erkrankungen. So ging eine ketogene Diät bei Epileptikern mit einer Reduktion der Anfallsrate einher (67). Auch wird ein positiver Effekt auf den Verlauf einer Multiplen Sklerose und psychiatrischen Erkrankungen diskutiert. Demenzen sind natürlich auch hier von wissenschaftlichem Interesse. Fasten und ketogene Diäten könnten diesbezüglich eine vorbeugende oder sogar eine therapeutische Wirkung entwickeln. In diesem Kontext stellten Kuhla et al. bei Mäusen nach CR eine Verbesserung kognitiver Prozesse fest (68). Vermutungen zufolge liegt ein Grund in der antiinflammatorischen Wirkung der Ketonkörper selbst (69). Jedoch ist auch ein neuroprotektiver Einfluss über die FGF21-Kaskade denkbar.

Ein eindrucksvolles Beispiel für die Auswirkungen des Fastens auf das Gehirn liefert die Natur selbst. Der Winterschlaf, auch Hibernation genannt, ist eine schlafähnliche Adaptation mancher Tiere, um unbeschadet die Kalte Jahreszeit zu überleben. Die Hibernation kann man in den Schlafzustand (Torpor) und den kurzfristigen Wachphasen (brief interbount arousals = IBAs) einteilen. Einher geht der Torpor mit einem Herabsetzen der Körperfunktionen einschließlich Körpertemperatur, Herzfrequenz und Atmung. Hinzu kommt die durch die Nahrungsabstinenz entstehende lipolytische Stoffwechselumstellung. Popov und Bocharova stellten 1992 während des Torpors von Erdhörnchen eine regressive Veränderung synaptischer Kontakte fest, welche nach Erwachen wieder vollkommen reversibel ist. Der Hippocampus unterliegt dabei einer ausgesprochen großen neuronalen Plastizität (70). Auf dieser Basis untersuchten Arendt et al. im Hinblick auf die AD die durch die Hyperphosphorylierung entstehenden gepaart-helikale neurofibrilläre Bündel (Paired Helical Filaments = PHFs) während des Winterschlafes und stellten Ähnliches fest.

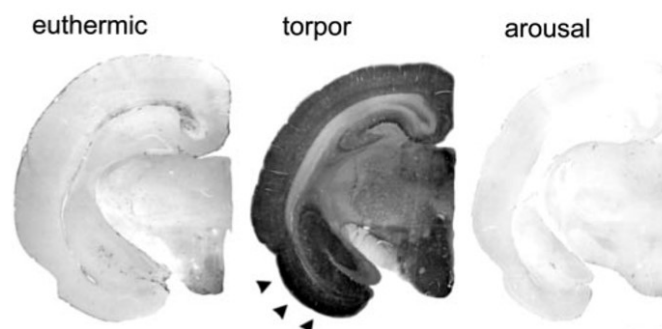


Abb. 6 Immunhistochemische Detektion von phosphoryliertem Tau, die Pfeile zeigen die besonders starke Reaktion am entorhinalen Kortex, Arendt et al. 2003 (71)

Wie in Abbildung 6 dargestellt, wurde während des Torpors eine deutliche Erhöhung des phosphorylierten Tau-Proteins nachgewiesen. Nach dem Aufwachen ist dieser Zustand jedoch vollständig invertiert und mit einem euthermen Erdhörnchen, welches sich nicht in Hibernation befindet, vergleichbar (71).

Auch FGF21 ist während der Stoffwechselumstellung bei Hibernation von besonderer Relevanz. Nelson et al. beschäftigten sich 2013 genauer mit dem Einfluss des Faktors beim Winterschlaf von Erdhörnchen. Dazu wurden unter anderem der hepatische mRNA-Gehalt von FGF21 und die FGF21-Serumkonzentration vor, nach und während der Hibernation gemessen. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse im Vergleich zum Zustand vor dem Winterschlaf im August (AUG). Während es beim Torpor (TOR) lediglich zu einem leichten (nicht-signifikanten) Anstieg von FGF21 kommt, erhöht sich die FGF21-mRNA und die FGF21-Serumkonzentration während des IBA signifikant. Am Ende der Hibernation, im März (MAR), fällt FGF21 wieder auf das ursprüngliche Niveau ab. Dies deutet darauf hin, dass die hohe Konzentration von FGF21 während des IBA zu einer neuen Runde Torpor führen kann und somit bei der Induktion involviert ist (72).

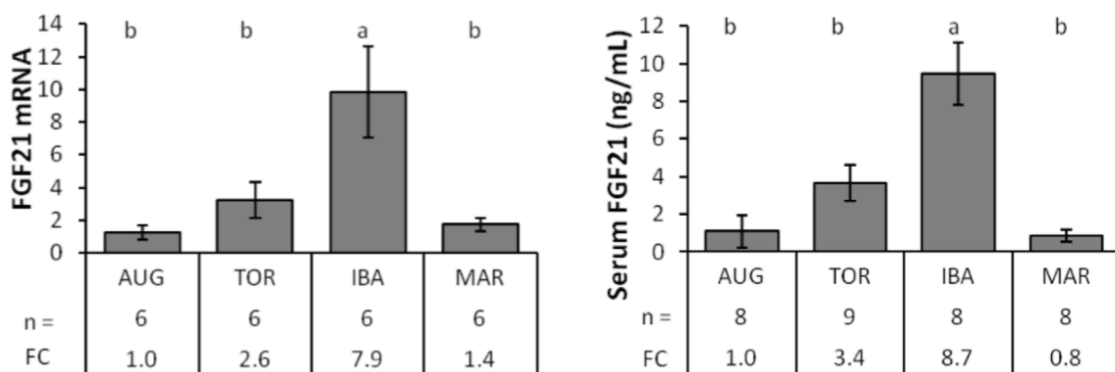


Abb. 7 FGF21 mRNA-Expression (links) und Serumkonzentration (rechts) vor, nach und während der Hibernation, Nelson et al. 2013 (72)

Welcher Zusammenhang nun zwischen der reversiblen AD-Pathologie und dem erhöhten FGF21-Spiegel während der Aufwachphase besteht, kann nur spekuliert werden. Denkbar wäre aber, dass die FGF21-Expression an den neuroprotektiven Prozessen, wie der Ausbildung synaptischer Kontakte und der Reduktion des phosphorylierten Tau-Proteins, beteiligt ist. Jenes könnte dann über die oben genannte pFGFR1c-pERK1/2-pAMPK-mTOR-Kaskade ablaufen. Aber auch die hervorgerufene Energieunterversorgung, welche mit einer hohen AMP/ATP-Ratio einhergeht, bietet die Möglichkeit einer unmittelbaren AMPK-Phosphorylierung mit der Aktivierung der Endstrecke selbiger Kaskade.

Unser Projekt könnte einen wichtigen Schritt zur Aufklärung dieser Relation erbringen.

1.6 Hypothese

Ziel dieser Studie war es, das neuroprotektive Potential von FGF21 besser zu charakterisieren. Nicht ohne Grund besteht zum jetzigen Zeitpunkt ein sehr großes Interesse, den Pathway des Faktors nachvollziehen und ihn somit als therapeutisches Target nutzen zu können.

Beim Metabolischen Syndrom mit Nahrungsüberschuss entsteht durch die Hypercholesterinämie mit erniedrigtem ApoE und ABCA1 sowie erhöhtem oxidativen Stress eine Neurodegeneration mit Demenz (Abb. 8, rechte Seite). Bei Nahrungsdefizit bzw. CR ist jedoch naheliegend, dass FGF21 endogen in der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert wird, die Blut-Hirn-Schranke überwindet und dort über eine Regulation von ERK1/2 und AMPK einer neuronalen Degeneration vorbeugen kann (Abb. 8, linke Seite).

Diese Hypothese galt es, mit einem adäquaten Studiendesign zu untersuchen.

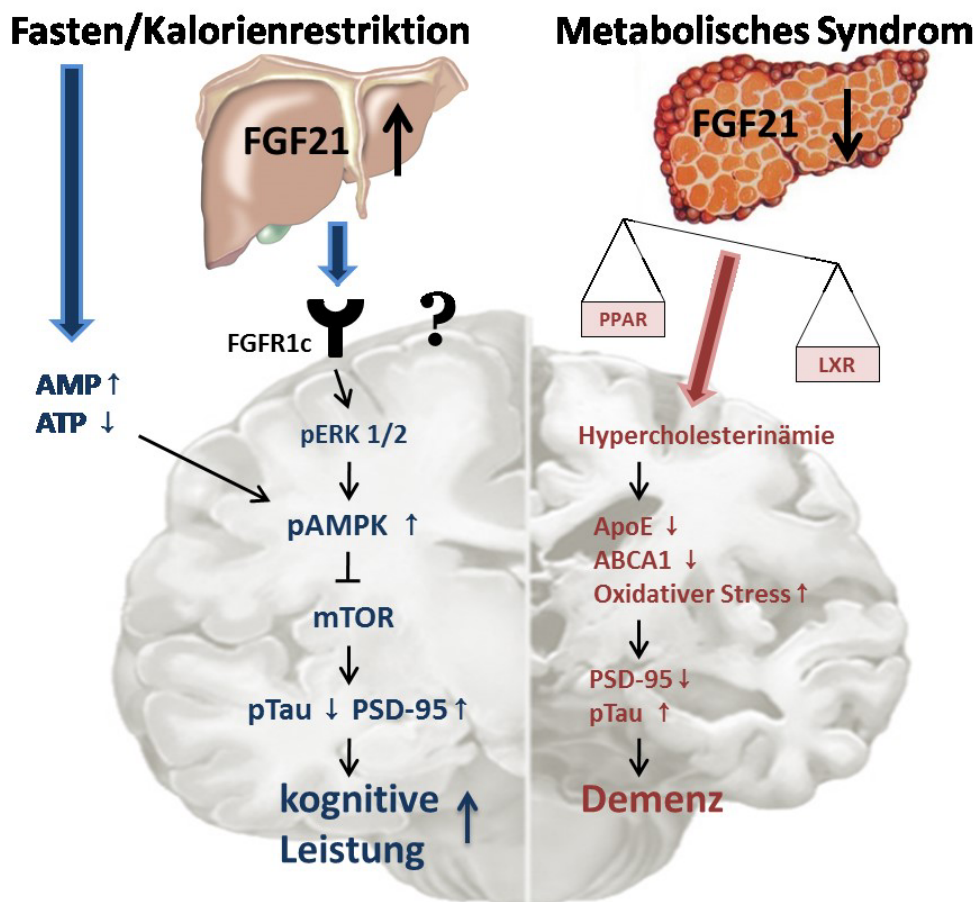


Abb. 8 Hypothetischer FGF21-Pathway nach Kalorienrestriktion (links) und mögliche neurodegenerative Auswirkung eines Metabolischen Syndroms (rechts)

2 Material und Methodik

2.1 ApoE(-/-)-Maus

Zur Untersuchung unserer Hypothese haben wir uns für ein Modell mit ApoE-Knockout-Mäusen (Charles River Wiga, Sulzfeld, Dtl.) entschieden. Mäuse ohne Apolipoprotein-E-Gen sind für die Imitation einer Neurodegeneration und im weiteren Sinne eines Morbus Alzheimer (vor allem der sporadischen Form) geeignet. Dies kommt dadurch zustande, dass der Knockout durchaus mit dem natürlichen Apo ϵ_4 -Polymorphismus vergleichbar ist. Die protektiven Eigenschaften bei zytoskelettaler und synaptischer Entwicklung der Nervenzellen können nicht mehr greifen. Mit zunehmendem Alter sollte sich also ein verstärkter kognitiver Verfall entwickeln.

Interessanterweise konnte unsere Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld herausfinden, dass die hepatische mRNA-Synthese von FGF21 bei ApoE-Knockout-Mäusen im Vergleich zur C57BL/6-Maus signifikant vermindert ist (Abb. 9). Dies wurde sowohl bei 4 als auch bei 20 und 74 Wochen alten Tieren festgestellt, was vermuten lässt, dass zwischen FGF21 und den ApoE-Signalwegen eine Korrelation besteht. In dieser Studie soll diesem FGF21-Defizit mit den damit verbundenen kognitiven Beeinträchtigungen entgegengewirkt werden, indem eine CR bei ApoE(-/-)-Mäusen endogen die FGF21-Synthese hochreguliert und infolgedessen den neuroprotektiven Pathway (FGFR1c \rightarrow pAMPK \rightarrow mTOR \rightarrow pTau \downarrow + PSD-95 \uparrow) stimuliert.

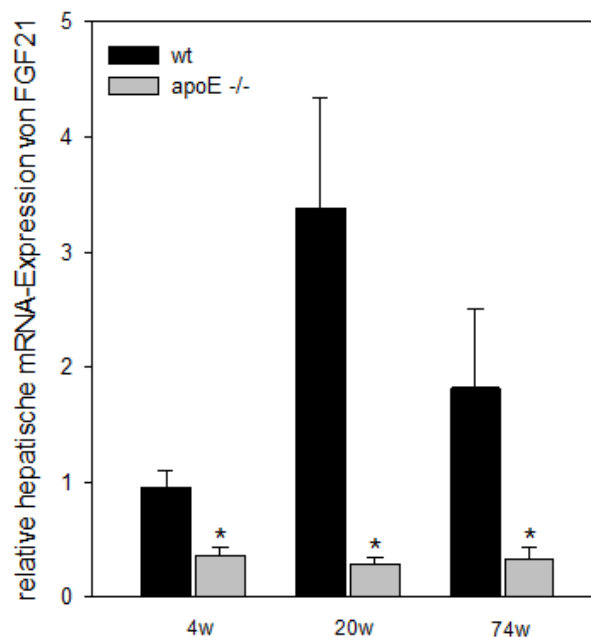


Abb. 9 Relative hepatische FGF21-mRNA-Expression von ApoE-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (Wildtyp=wt) im Alter von 4, 20 und 74 Wochen

2.2 Studiendesign

Abbildung 10 zeigt schematisch den zeitlichen Ablauf der hierfür notwendigen Experimente.

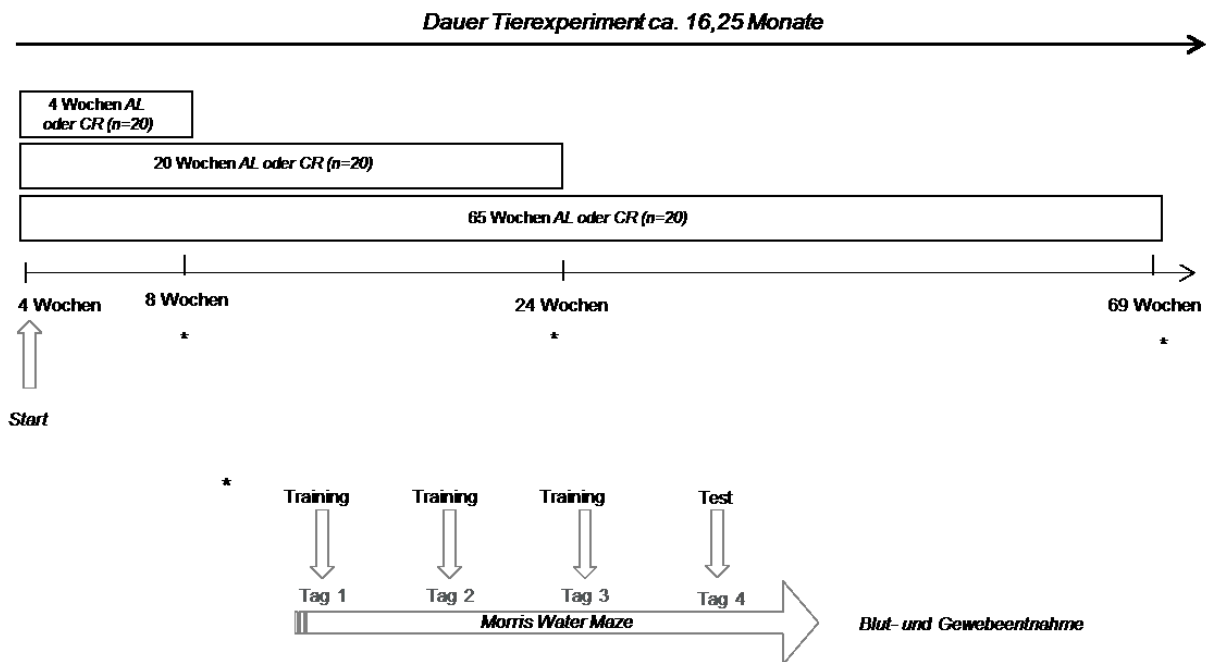


Abb. 10 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Tierexperimente

4 Wochen alte ApoE(-/-)-Mäuse wurden 4, 20 oder 65 Wochen lang entweder ad libitum (AL – die Tiere können unbegrenzt Nahrung aufnehmen) oder kalorienrestriktiv (CR – um 40% reduzierte Nahrungsaufnahme) ernährt. Diesen Fütterungsphasen schloss sich ein 4-tägiger Test im Morris Water Maze zur Ermittlung kognitiver Leistung an. Daraufhin wurden Leber und Gehirn zur Untersuchung der Expression der Zielgene und -proteine von FGF21 entnommen. Eine letzte Blutabnahme zur Bestimmung der FGF21-Plasmakonzentration wurde ebenfalls durchgeführt.

Die Tiere wurden zu je 5 Mäusen pro Käfig in einem temperaturüberwachten Raum ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) mit 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus und freiem Zugang zu Wasser gehalten. Wöchentlich wurde das Gewicht kontrolliert, vierwöchentlich $<20 \mu\text{l}$ Blut retrobulbär zur FGF21-Konzentrationsanalyse entnommen.

2.3 Kalorienrestriktion

Sowohl die AL- als auch die CR-gefütterten Mäuse erhielten ssniff® M-Z V1125-o Futter mit 53% Kohlenhydrat-, 36% Protein- und 11% Fettanteil. Pro Woche wurde den AL-gefütterten Mäusen 210 Gramm Nahrung bereitgestellt, um zu gewährleisten, dass für jede Maus immer Futter vorhanden war. Die Ernährung der CR-gefütterten Mäuse bestand aus der Reduzierung des Futters auf 60% der

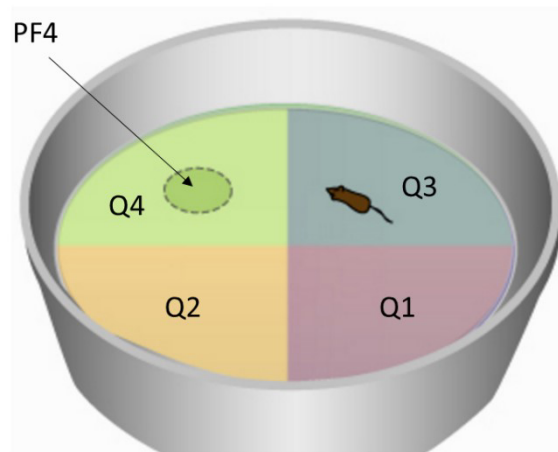
in der Vorwoche von den AL-gefütterten Mäusen aufgenommenen Nahrung. Wöchentlich wurde dieser Wert durch das Wiegen des verbliebenen Futters der AL-gefütterten Mäuse neu ermittelt.

2.4 Morris Water Maze

Mit dem Morris Water Maze (MWM) ist es möglich, das räumliche Lernen bei Nagetieren zu testen. Der Versuchsaufbau besteht aus einem runden mit Wasser gefüllten Becken, welches in vier Quadranten eingeteilt ist (Abbildung 11). Der Versuch gliedert sich in zwei Abschnitte: Training und Testtag. Das Training basiert darauf, dass die Maus an verschiedenen Stellen ins Wasser gelassen wird und den Weg zu einer „rettenden“ Plattform (PF₄) im vierten Quadranten finden muss. Diese Plattform ist verdeckt, da sie sich knapp unter dem Wasserspiegel befindet und damit für die Maus nicht zu sehen ist. Dieses Training führt man 3 Tage durch, sodass die Plattform bei intaktem räumlichen Gedächtnis mit der Zeit schneller gefunden wird. Dabei werden vor allem die Neuronen des Hippocampus beansprucht, welche bei Morbus Alzheimer als eine der ersten zugrunde gehen. Am vierten Tag erfolgt der eigentliche Test, bei dem die Plattform aus dem Wasser entfernt wird und das Verhalten der Maus beim Schwimmen aufgenommen wird.

Der Versuch wird in vier Tage unterteilt:

- Tag 1. Die Maus wird im ersten Quadranten des Beckens ins Wasser gelassen. Nun soll sie 90 Sekunden schwimmen und die PF₄ innerhalb der Zeit finden. Falls letzteres nicht erfüllt wird, führt man das Tier langsam an die PF₄ heran und lässt sie die letzten 20 Sekunden darauf verweilen. Dieser Tag dient vor allem der Gewöhnung der Maus an das Wasser und die neue Situation mit der Plattform als „rettendes Ufer“. Danach wird die Maus aus dem Becken entnommen.
- Tag 2. Der Tag besteht aus zwei Trainingsblöcken zu je zwei Durchlaufen à 60 Sekunden. Die Startposition des ersten Durchlaufes ist zwischen dem ersten und zweiten Quadranten. Die des zweiten zwischen dem ersten und dritten Quadranten. Nachdem die PF₄ gefunden wurde, darf die Maus noch 10 Sekunden sitzen bleiben.
- Tag 3. Es wird Tag 2 wiederholt, wobei nur ein Trainingsblock durchgeführt wird.
- Tag 4. Dies ist der Tag des eigentlichen Tests. Die PF₄ wird entfernt und die Maus im Zentrum des ersten Quadranten ins Becken gesetzt. Dort lässt man sie 60 Sekunden lang schwimmen.



PF=Plattform
Q=Quadrant

Abb. 11 Abbildung des Beckens, Lynn Talton 2007

Jede Maus muss also sieben Mal im Becken das Training absolvieren und wird beim achten Mal getestet. Bei allen Mäusen wurden gleiche Bedingungen geschaffen: gleiche Tageszeit der Tests, Wassertemperatur von 20-22°C, die Mäuse werden mit dem Gesicht zur Beckenwand ins Wasser gesetzt, stilles Arbeiten. Das Becken wurde während des Schwimmens mit einer Kamera aufgezeichnet und das Video später ausgewertet.

2.5 Organentnahme

Im Anschluss an das MWM wurde eine Injektionsnarkose mit einer Kombination aus Ketamin (75 mg/kg KG) und Xylazin (6,25 mg/kg KG) durchgeführt. Die Tötung erfolge nach retrobulbärer Blutentnahme (500 µl) mittels zervikaler Dislokation. Im Folgenden wurden Leber und Gehirn entnommen und bei -80°C gelagert.

Das Plasma wurde nach 10-minütiger Zentrifugierung bei 3000 Umdrehungen pro Minute vom Sediment getrennt und folgend bei -20°C gelagert.

2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels ELISA wurden die FGF21-Konzentrationen im Blut der Mäuse über den Zeitraum der Studie ermittelt. Das Verfahren beruht auf der Sandwich-Methode. Hierbei wurde die jeweilige Plasmaprobe auf eine Mikroplatte pipettiert, in deren Wells immobile FGF21-Antikörper fixiert sind. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Enzym-gebundenen polyklonalen Antikörpern, spezifisch für Maus-FGF21. Das danach zugegebene Substrat vermittelte eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten durch eine Stop-Lösung angehalten wurde. Photometrisch konnte die Absorption der Proben bei

450 nm festgestellt werden. Die Absorption ist dabei proportional zur Konzentration des FGF21. Um Fehler zu minimieren, wurde eine Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgeführt. Zur Durchführung wurde das Quantikine® ELISA für Mäuse/Ratten genutzt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.7 Genexpressionsanalytik

Grundsätzlich vollzieht sich die Analytik der Genexpression von FGF21, PPAR γ und ABCA1 in 6 Schritten. Als erstes isoliert man die RNA aus dem Gewebe. Danach wird photometrisch die RNA-Konzentration bestimmt. Anschließend wird eine Gelelektrophorese durchgeführt, gefolgt von der Umschreibung der RNA in cDNA. Diese wird mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt, um im letzten Schritt per $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Genexpression zu quantifizieren.

2.7.1 Isolierung

Zur Vorbereitung wurden 30 mg Hirn- und Lebergewebe unter stetiger Kühlung durch einen Mikrodismembrator vermahlen. Um die RNA isolieren zu können, wurde das RNeasy® Mini Prep Kit 250 der Firma QIAGEN verwendet (<https://www.qiagen.com/de/shop/sample-technologies/rna/rna-preparation/rneasy-mini-kit#productdetails>, 15.02.2015). Es wurde stets nach den Angaben des Herstellers RNase-frei und sauber gearbeitet. Zunächst wurde das Gewebe lysiert und homogenisiert. Das mitgelieferte Puffersystem konnte danach die selektive Bindung der RNA an eine Silica-Gel-Membran der RNeasy mini spin Säulen gewährleisten. Durch das RNase-Free DNase Set erfolgte ein DNA-Verdau, um Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden. Mit Diethyldicarbonat-Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$) konnte die isolierte RNA aus der Säule eluiert werden. Für die weitere Verarbeitung erfolgte eine mindestens 24-stündige Kühlung bei -80°C .

2.7.2 Photometrische Quantifizierung

Die photometrische Untersuchung dient sowohl der Messung der Konzentration als auch der Bestimmung der Reinheit der gewonnenen RNA. Mithilfe des NanoDrop-Spektraphotometers wurde die Absorption bei 230, 260 und 280 nm von der Nukleinsäuresuspension gemessen. Als Referenz wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ verwendet. Die Konzentration ist dabei proportional zur Lichtabsorption. Die NanoDrop-Software ermittelte den Absorptionskoeffizient und daraus die Konzentration. Zur Beurteilung des Reinheitsgrades dient das Verhältnis von der Absorption von 260 nm zu 280 nm und von 260 nm zu 230 nm. Das Verhältnis 260/280 sollte nahezu 2 betragen, während das Verhältnis 260/230 zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte.

2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Reinheit der RNA zu untersuchen, bediente man sich einer Gelelektrophorese. Als Träger wurde ein 1%iges Agarosegel (Tabelle 1, Tabelle 2) hergestellt. Von jeder Probe wurden 1 µl mit 10 µl H₂O_{DEPC} und 1 µl Ladepuffer (Tabelle 3) verdünnt.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	5-10 ml
1x TRIS-Acetat-EDTA-Puffer	100 ml
Agarose	1 g
Gelstar®Lonza	2,5 µl

Tab. 1 Bestandteile des 1%igen Agarosegels

Substanzen	Menge
Aqua dest.	1 l
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	243,3 g
1 M Na-Acetat – 3 H ₂ O	136,08 g
50 mM Na ₂ EDTA	18,61 g

Tab. 2 Bestandteile des TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)

Substanzen	Menge
Aqua dest.	1 l
87% Glycerol	5,75 ml
0,5 M EDTA	20 µl
Bromphenolblau	40 mg
Xylene Cyanol	40 mg

Tab. 3 Zusammensetzung des Ladepuffers

Aus diesem Probenansatz wurden 10 µl in eine Tasche pipettiert und bei 80 Volt 50 bis 60 Minuten aufgetrennt.

2.7.4 cDNA-Herstellung

Zur Synthese der cDNA wurde vorab ein Denaturierungsansatz (Tabelle 4) für jede Probe hergestellt. Dabei dienen Oligo-Desoxythymidine als Primer für die reverse Transkriptase (RT). Diese binden komplementär an den Poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA. Mittels Thermocycler wurden die Proben bei 72°C für 10 Minuten denaturiert. Nachfolgend wurde den Ansätzen für die reverse Transkriptase ein Mastermix (Tabelle 5) hinzugefügt.

Substanzen	Menge
RNA	2 µg
H ₂ O _{DEPC}	11 µl
Oligo(dT) ₁₈ -Primer	1 µl

Tab. 4 Zusammensetzung des Denaturierungsansatzes

Substanzen	Menge
5x First Strand Buffer	4 µl
0,1 M D-dopachrome tautomerase	2 µl
10 mM dNTP	1 µl
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	1 µl

Tab. 5 Bestandteile des RT-Mastermix-Ansatzes

Nach dem Durchlauf des RT-Programms über 65 Minuten bei 42°C wurden die Proben im Thermocycler auf 4°C herunter gekühlt und anschließend mit PCR-Wasser 1:2 verdünnt. Diese wurden dann bei -20°C gelagert.

2.7.5 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Mit der Methode der RT-qPCR lassen sich Nukleinsäuren vervielfältigen und – im Gegensatz zur klassischen PCR – ein bestimmtes Transkript mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifizieren. Dabei wurde das Kit Lightcycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics GmbH, Dtl.) verwendet und nach den Arbeitsanweisungen ordnungsgemäß durchgeführt. SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion doppelsträngiger DNA. Damit nimmt das Fluoreszenzsignal proportional mit der Menge an PCR-Produkt zu. Auch für die RT-qPCR mussten Mastermixe (Tabelle 6) mit dem entsprechenden Primer-Mix hergestellt werden.

Substanzen	Menge pro Ansatz
PCR-Wasser	14 µl
Primer-Mix [10 µM]	1 µl
Vial 1 (Reaktionsreagenz)	4 µl

Tab. 6 Bestandteile der RT-qPCR Mastermixe

Der Primer-Mix entstand aus 80 µl PCR-Wasser und 10 µl der jeweils zu den untersuchten Genen passenden Primern (Tabelle 7). In jede Glaskapillare wurden 19 µl Mastermix mit 1 µl Probe gefüllt. Hinzu kamen eine Positivkontrolle (1:2 verdünnter C57BL/6-Maus-Genpool [genetischer Background

des ApoE(-/-)-Stammes]) und eine Negativkontrolle (PCR-Wasser), um Verunreinigungen in der Lösung oder falsch-positive Signale/Amplifikate auszuschließen.

Primer	Orientierung	Sequenz 5' → 3'	Fragmentgröße	Schmelzpunkt
ABCA1	fwd	ACT-GGA-GAC-ACC-CCT-GTG-AC	285 bp	87,2 °C
	rev	GGA-GAG-CTT-TCG-TTT-GTT-GC		
FGF21	fwd	GCT-GTC-TTC-CTG-CTG-GGG	409 bp	91,3 °C
	rev	CCT-GGT-TTG-GGG-AGT-CCT-TC		
PPARγ	fwd	TCA-TGA-CCA-GGG-AGT-TCC-TC	241 bp	89,6 °C
	rev	CAG-GTT-GTC-TTG-GAT-GTC-CTC		
RPS 18	fwd	AGG-ATG-TGA-AGG-ATG-GGA-AG	184 bp	90,5 °C
	rev	TTG-GAT-ACA-CCC-ACA-GTT-CG		

Tab. 7 Primer für die RT-qPCR; das ribosomale Protein 18 S-Gen (RPS 18) diente hier als Housekeeping-Gen

Es folgte die Durchführung der PCR durch den Lightcycler® (Roche). Das Temperaturprofil ist in Tabelle 8 dargestellt. Mithilfe der Lightcycler® Software 3.5 wurden die Ergebnisse graphisch erfasst.

Zyklus	Zeit [min]	Temperatur [°C]
1. Initiale Denaturierung	10	95
2. Amplifikation (40 Wiederholungen)	5	55
	10	72
	0	95
3. Schmelzkurve	0,25	65
	0	95
4. kontinuierlich	0	95
5. Kühlung	30	4

Tab. 8 Temperaturprofil des Lightcyclers®

2.7.6 Relative Quantifizierung der Genexpression

Die relative Quantifizierung wurde mit dem $\Delta\Delta C_t$ Threshold ($\Delta\Delta C_t$) ermöglicht. Relativ heißt, dass die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten Housekeeping-Gens (HKG) normalisiert wurde. Die Vorteile gegenüber der Messung der absoluten Genexpression liegen in der Reduzierung der Varianz der Ergebnisse, da beispielsweise Matrix-/Gewebeeffekte sowie Fehler innerhalb der Probe gleichermaßen das Zielgen und das HKG betreffen. Hier wurde als HKG das RPS 18 verwendet.

Der C_t gibt hierbei den PCR-Zyklus an, bei dem ein gegenüber der Hintergrundfluoreszenz signifikant höheres Signal detektiert wurde. Für jedes Gen existiert also ein eigener C_t , welcher vom

Lightcycler®-Programm ermittelt wurde. Durch Subtraktion des HKG- C_t vom Zielgen- C_t berechnete man ΔC_t . Im zweiten Schritt wurde durch Subtraktion des ΔC_t der Positivkontrolle vom ΔC_t des Zielgens der $\Delta\Delta C_t$ ermittelt. Abschließend wurde daraus die Ratio bestimmt, welche eine adäquate Aussagekraft zum relativen Expressionsunterschied besitzt. Zusammengefasst ergeben sich also folgende drei Schritte zur relativen Quantifizierung:

1. $\Delta C_t = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{HKG}}$
2. $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{Zielgen}} - \Delta C_{t\text{Positivkontrolle}}$
3. $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

2.8 Proteinanalytik

Durch die Proteinanalytik erhofften wir uns, Rückschlüsse auf die intrazelluläre Signalkaskade des FGF21 zu ziehen. Möglich war dies durch die Analyse des entnommenen Gewebes bezüglich der Zielproteine ERK, AMPK und als Marker für neurodegenerative Prozesse Tau. Alle wurden sowohl im phosphorylierten als auch im nicht-phosphorylierten Zustand untersucht.

Wie auch bei der Genexpressionsanalytik wurde mit der Isolation der zu untersuchenden Proteine begonnen. Im Anschluss wurden Konzentrationen bestimmt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Danach konnte man diese durch einen Semi-Dry-Western-Blot auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen transferieren. Es folgten zwei Immundetektionen mit spezifischen Antikörpern und abschließend eine densitometrische Quantifizierung.

2.8.1 Proteinisolierung

Zur Vorbereitung wurden 30 mg Gehirngewebe mit einem Dismembrator zerkleinert. Im Anschluss wurde zur Proteinextraktion zu jeder Gewebeprobe Lysispuffer (Tabelle 9) mit PhosSTOP™ (Roche) (1 Tablette pro 10 ml Lysispuffer) hinzugefügt.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	9,026 ml
1 M TRIS pH 7,5	100 µl
5 M NaCl	20 µl
250 mM EDTA	4 µl
10% Triton X-100	500 µl
4% NaN ₃	50 µl
100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid	200 µl
Protease Inhibitor Cocktail	100 µl

Tab. 9 Bestandteile des Lysispuffers

Um ein homogenes Lysat gewährleisten zu können, mussten die Proben bei der 30-minütigen Inkubationszeit mehrfach gevortext werden. Danach wurden sie 10 Minuten bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 1:10 verdünnt.

2.8.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung der Proteine erfolgte nach der BCA-Methode. Die Grundlage dieses Verfahrens ist, dass durch zwei Moleküle Bicinchoninsäure und einem Molekül einwertigem Kupfer, welches in der Gegenwart von Peptidbindungen entsteht, ein violetter Chelatkomplex entsteht. Dieser kann photometrisch erfasst werden. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung. Für die Standardreihe wurde bovines Serumalbumin (BSA) in 0,9% NaCl mit den Konzentrationen 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1 mg/ml verwendet. Mithilfe der Standardreihe und destilliertem Wasser als blank konnte eine Eichkurve zur Bestimmung der Proteinkonzentration ermittelt werden. Das BCA-Reagenz wurde aus 50 Volumenanteilen der BCA™ Protein Assay Reagenz A und einem Anteil der Reagenz B (beide von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Dtl.) unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Nach einer 30-minütigen Schüttelinkubation bei 37°C wurde durch einen Plattenphotometer die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch die Software Magellan 3 wurde aus dem Mittelwert der Dreifachbestimmung die Proteinkonzentration in µg/µl errechnet.

2.8.3 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. SDS bindet hierbei an die Proteine und führt zu einer gleichwertigen negativen Ladung aller Proben. Dadurch können die Proteine je nach Molekulargewicht bei einer angelegten Spannung unterschiedlich schnell wandern. Für die optimale Bandenschärfe im untersuchten Größenbereich wurde die SDS-PAGE diskontinuierlich mit einem weitporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel durchgeführt. Das Trenngel musste dafür an das Molekulargewicht der zu untersuchenden Zielproteine angepasst werden. Es wurden 8%ige (>50 kDa), 10%ige (ca. 50 kDa) und 12%ige (30-50 kDa) SDS-Gele verwendet (Tabelle 10). Für das Gießen der Gele wurden die Apparaturen des Mini-Protean® 3 CELL-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, Dtl.) verwendet.

Als erstes wurde das Trenngel gegossen und mit 100%igem Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation konnte das Isopropanol entfernt und das Sammelgel über das Trenngel gegossen werden.

Substanzen	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	5%
Aqua dest.	1,675 ml	1,375 ml	1,025 ml	1,0375 ml
TRIS pH 8,8	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	---
TRIS pH 6,8	---	---	---	0,1875 ml
Acrylamid	1,350 ml	1,650 ml	2 ml	0,25 µl
10% SDS	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl	50 µl	12,5 µl
Tetramethylethyldiamin	5 µl	5 µl	5 µl	1,25 µl

Tab. 10 SDS-Mini-Gel-Ansatz (Dicke 1,5 mm)

Die Proben wurden auf eine Konzentration von 40 µg/µl eingestellt und mit 2x Probenpuffer (Tabelle 11) versetzt. Der Ansatz wurde mit 1x Probenpuffer auf 25 µl aufgefüllt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Probenansätze bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und auf Eis gestellt.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	20 ml
1 M TRIS 6,6	2,5 ml
SDS	0,8 g
87% Glycerin	4,56 g
DTT	154,2 mg
Bromphenolblau	0,2 ml

Tab. 11 Zusammensetzung 2x Protein-Probenpuffer

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die fertigen SDS-PAGE-Gele in die mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 12) befüllte Elektrophoreseeinheit eingesetzt und die Probenansätze in die mit einem Kamm erzeugten Taschen pipettiert.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	1 l
TRIS	30,3 g
Glycin	144 g
SDS	10 g

Tab. 12 Bestandteile des Elektrophoresepuffers (pH 8,3)

In eine Tasche jedes Gels wurde der Proteinmarker peqGOLD mitgeführt, um die Größenbestimmung der zu untersuchenden Proteinbanden zu gewährleisten. Die Auftrennung wurde mit 10 mA begonnen bis die Proben das Sammelgel durchwandert hatten. Anschließend wurde die Stromstär-

ke auf 20 mA erhöht und die Auftrennung beendet, sobald der Proteinmarker sich ausreichend aufgetrennt hatte.

2.8.4 Semidry-Western-Blot

Um die aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membranen zu transferieren, mussten die Blotting-Papiere in den entsprechenden Puffern (Tabelle 13) vorbereitet werden.

Substanzen	Menge		
	Anodenpuffer I pH 10,4	Anodenpuffer II pH 10,4	Kathodenpuffer pH 9,4
Aqua dest.	1 l	1 l	1 l
Glycin	---	---	3,004 g
TRIS	36,342 g	3,028 g	3,028 g
Methanol	200 ml	200 ml	200 ml

Tab. 13 Zusammensetzung der Transferpuffer

In Abbildung 12 ist der Aufbau eines Semidry-Blots schematisch abgebildet. Der Name beruht auf der Tatsache, dass lediglich die Blotting-Papiere puffergesättigt sind.



Abb. 12 Schematische Darstellung eines Semidry-Western-Blots

Die Membranen mussten für 15 Sekunden in 100%igem Methanol aktiviert werden, bevor sie für zwei Minuten in destilliertes Wasser getaucht wurden. Danach wurden sie für mindestens 5 Minuten im Anodenpuffer II äquilibriert. Nachdem die Gele auf den Membranen platziert wurden, konnte der Transfer bei 2,8 mA/cm² durchgeführt werden. Nach dem einstündigen Transfer wurden die Membranen in TRIS-buffered saline with Tween20 (TBST, Tabelle 14) gründlich gewaschen. Die Bestandteile des TRIS-buffered saline (TBS) sind in Tabelle 15 dargestellt.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	900 ml
10 x TBS	100 ml
Tween20®	1 g

Tab. 14 Zusammensetzung des 1x TBST

Substanzen	Menge
Aqua dest.	1 l
TRIS	2,42 g
NaCl	8 g

Tab. 15 Zusammensetzung vom 1x TBS

Damit unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden, wurden die Membranen 30 Minuten mit 2,5% BSA geblockt.

2.8.5 Immundetektion

Alle Inkubations- und Waschschrte wurden bei der Immundetektion unter stetiger Bewegung auf der Schüttelplatte durchgeführt.

Als erstes wurden die Membranen über Nacht mit den jeweiligen in BSA verdünnten Antikörpern (Tabelle 16) bei 4°C inkubiert. Als Housekeeping-Proteine dienten die nicht-phosphorylierten Formen der Proteine beziehungsweise β -Aktin und GAPDH. Anschließend folgten drei Waschzyklen á 5 Minuten in 1x TBST (Tabelle 14) und drei Waschzyklen á 5 Minuten in 1x TBS (Tabelle 15).

Antikörper	Host	Klonalität	Molekulargewicht	Verdünnung
Anti-pAMPK	Hase	monoklonal	62 kDa	1:1.000
Anti-AMPK	Hase	polyklonal	62 kDa	1:1.000
Anti- β -Aktin	Maus	monoklonal	47 kDa	1:20.000
Anti-phosph-p44/42 MAPK (pERK1/2)	Hase	polyklonal	44/42 kDa	1:1.000
Anti-p44/42 MAPK (ERK1/2)	Hase	monoklonal	44/42 kDa	1:1.000
Anti-pTau	Maus	monoklonal	50-80 kDa	1:1.000
Anti-Tau	Maus	monoklonal	50-80 kDa	1:1.000
Anti-pFGFR1c	Hase	polyklonal	120/145 kDa	1:1.000
Anti-FGFR1c	Hase	monoklonal	92/120/145 kDa	1:1.000
Anti-GAPDH	Maus	monoklonal	36/146 kDa	1:20.000

Tab. 16 Primärantikörper (Cell Signaling®)

Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (Tabelle 17) für eine Stunde. An diesen waren eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden, die dann das in der Detektionslösung (Pierce ECL Western Blotting Substrate, GE Healthcare Dtl.) vorhandene Substrat in einen Fluorophor umsetzte.

Antikörper	Host	Target	Konjugat	Verdünnung
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Pferd	pAMPK	HRP	1:10.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Pferd	AMPK	HRP	1:10.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Ziege	pERK	HRP	1:5.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Ziege	ERK	HRP	1:5.000
Anti-mouse-IgG-HRP-linked	Pferd	pTau	HRP	1:10.000
Anti-mouse-IgG-HRP-linked	Pferd	Tau	HRP	1:10.000
Anti-mouse-IgG-HRP-linked	Hase	β -Aktin	HRP	1:60.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Ziege	pFGFR1c	HRP	1:10.000
Anti-rabbit-IgG-HRP-linked	Ziege	FGFR1c	HRP	1:10.000

Tab. 17 Sekundärantikörper (Cell Signaling®)

Nach erneuten Waschzyklen mit TBS und TBST wurde für 5 Minuten die Detektionslösung auf den Membranen inkubiert. Im Gel-Reader konnte die Chemilumineszenz der Reaktion gemessen werden und mithilfe des ChemicDoc™-XRS-Systems bei Expositionszeiten zwischen 50 und 500 Sekunden ausgewertet werden.

2.8.6 Zweitedektion

Um die geladene Proteinmenge zu verifizieren, wurde eine zweite Immundetektion durchgeführt. Vorerst musste der Primärantikörper von den Membranen entfernt werden, indem diese für 15 Minuten bei 37°C und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Strip-Lösung (Tabelle 18) gewaschen wurden.

Substanzen	Menge
Aqua dest.	500 ml
1% SDS	0,5 g
25 mM Glycin	0,938 g

Tab. 18 Zusammensetzung der Strip-Lösung

Im Anschluss an einen weiteren Waschzyklus (s. 2.8.5 Immundetektion) erfolgte der Ablauf wie bei der ersten Immundetektion. Als Primärantikörper (Tabelle 16) wurden homogen exprimierte Proteine verwendet. Hierfür dienten entweder die nicht-phosphorylierten Zielproteine (AMPK, ERK) oder die Housekeeping-Proteine β -Aktin und GAPDH.

2.8.7 Densitometrische Quantifizierung

Die Software Quantity One® 4.6.6 diente zur Auswertung der Ergebnisse. Nach Ermittlung der Intensitäten wurde der Quotient aus den Zielproteinen und Kontrollproteinen gebildet. Somit konnte die relative Proteinexpression bestimmt werden. Um eine Aussagekraft gewährleisten zu können, sollten die entsprechenden Proben-Banden der nicht-phosphorylierten Kontrollproteine beziehungsweise der Housekeeping-Proteine als Zeichen identischer Proteinmengen von gleicher Intensität sein.

2.9 Immunhistologie

Zur Untersuchung der Aktivität des FGFR1c und des Proteins mTOR sowie der Expression von PSD-95 und FGF21 wurde Gewebe vom Gehirn der Mäuse immunhistochemisch aufgearbeitet. Dazu wurde das Gehirn bis zu 6 Wochen in 4% Phosphat-gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt und auf X-tra® Adhesive Pre-cleaned Micro Slides (Leica Biosystems) aufgezogen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Antikörpern aus Tabelle 19 inkubiert.

Antikörper	Host	Klonalität	Verdünnung
Anti-FGF21 (Abcam®)	Hase	monoklonal	1:500
Anti-pFGFR1c (Cell Signaling®)	Hase	polyklonal	1:100
Anti-pmTOR (Cell Signaling®)	Hase	monoklonal	1:100
Anti-PSD-95 (Abcam®)	Hase	polyklonal	1:1.000

Tab. 19 Primärantikörper der immunhistochemischen Untersuchung

Zur Visualisierung der Primärantikörper wurden DAB chromogen Universal LSAB® kits (System-HRP; DakoCytomation; Dako®) nach Anleitung des Herstellers genutzt. Als Kernfärbung der Präparate diente Hämalun. Die Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop (Olympus® BX51) ausgewertet. Die Fotos wurden mit einer Color View II FW Kamera (Color View®) angefertigt.

2.10 Statistik

Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte und die standard errors of the mean (SEM) berechnet. Mittels ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test wurden Signifikanzen erhoben. Als signifikant wurden Unterschiede mit $p \leq 0,05$ bezeichnet. Die Software SigmaPlot (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA) diente der graphischen Darstellung der Ergebnisse.

3 Ergebnisse

3.1 Phänotyp und Verhalten der Mäuse

Grundsätzlich gab es mehrere Unterschiede zwischen den AL- und den CR-gefütterten Versuchsmäusen. Am auffälligsten war dabei das Gewicht. Dementsprechend musste die Menge des Blutes bei der Abnahme und die Narkosemittelmenge angepasst werden. AL-gefütterte Tiere waren deutlich schwerer aufgrund des uneingeschränkten Futters. Als Konsequenz waren sie jedoch auch träge. Im Vergleich zu den CR-gefütterten Mäusen wirkten sie ängstlicher und aggressiver, weshalb es sich schwieriger gestaltete, mit ihnen zu arbeiten. Die Versuchstiere unter CR waren insgesamt zierlicher, flinker und neugieriger. Fellfarbe und -beschaffenheit unterschieden sich nicht.

3.2 Gewichtsverlauf

Entsprechend der Nahrungsaufnahme sieht man einen deutlichen Gewichtsunterschied zwischen den AL- und CR-gefütterten Tieren (Abb. 13).

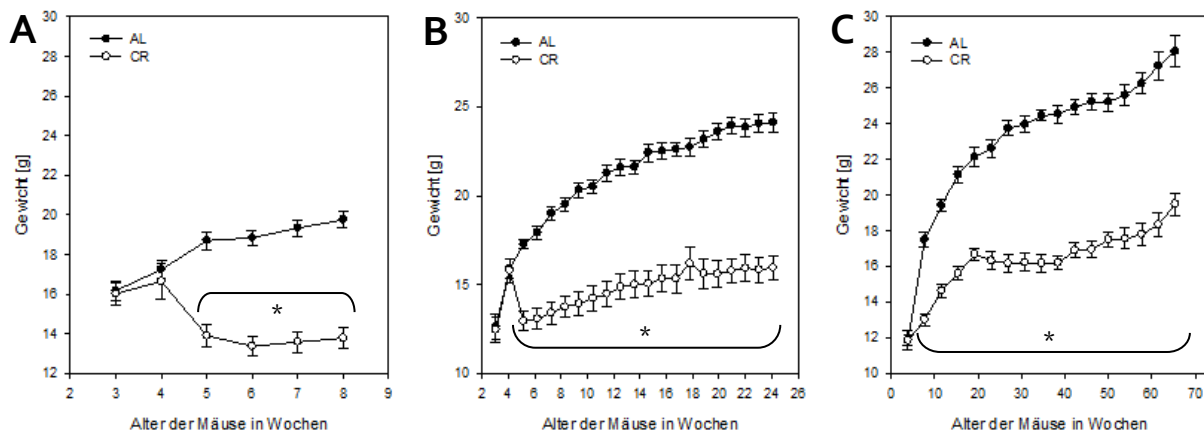


Abb. 13 Vergleich des Gewichtsverlaufes der ad libitum gefütterten Mäuse (AL) und der kalorienrestriktiv gefütterten Mäuse (CR) über 4 Wochen (A; AL: n=10, CR: n=10), über 20 Wochen (B; AL: n=10, CR: n=10) und über 65 Wochen (C; AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM; ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: * $p \leq 0,05$ vs. AL

Der Gewichtsverlauf der AL-gefütterten Mäuse erinnert an eine logarithmische Funktion. Jede Maus beginnt in der dritten Woche mit einem Gewicht zwischen 12 g und 15 g. Unter stetiger Gewichtszunahme nähern sich die Mäuse im Verlauf über 8 Wochen asymptotisch einem Gewicht von 20 g an (A). Die 24 Wochen alten AL-gefütterten Mäuse nehmen in gleicher Weise zu und verweilen nach 20 Wochen bei einem Gewicht von etwa 24 g (B). Die Gewichte derjenigen Mäuse unter 65-wöchiger kontrollierter AL-Fütterung steigen ab Versuchsbeginn steil an und verdoppeln sich nach etwa 20 Wochen. Es verringert sich sukzessive die Gewichtszunahme bis zur 50. Woche, nach welcher ein linearer Anstieg bis zum Versuchsende mit einem Endgewicht von circa 28 g folgt (C).

Annähernd gleichförmig bildet sich die Gewichtsveränderung bei den Mäusen unter CR ab. Auch diese Tiere beginnen mit einem Gewicht zwischen 12 g und 15 g. Nachdem mit der ersten Woche der kalorienrestriktiven Diät durch die plötzliche Einschränkung der Nahrung eine Inzsur mit einem Gewichtsverlust von circa 1-2 Gramm entsteht, ähneln nachfolgend die Graphen von CR-gefütterten Mäusen denen der jeweiligen AL-gefütterten Tiere stark, verlaufen aber – wie erwartet – weniger steil. Ab etwa der sechsten Woche ist das Gewichtsniveau der Tiere unter CR signifikant bis zum Versuchsende um durchschnittlich 30% gegenüber AL-gefütterten Mäusen reduziert.

Abbildung 14 zeigt in diesem Zusammenhang exemplarisch eine 69 Wochen alte AL-gefütterte Maus (links; Alter von 4 Wochen bei Versuchsbeginn + 65 Wochen Fütterungszeit) neben einer CR-gefütterten Maus gleichen Alters (rechts) beim Absolvieren des Morris Water Maze. Der Gewichtsunterschied ist offensichtlich.

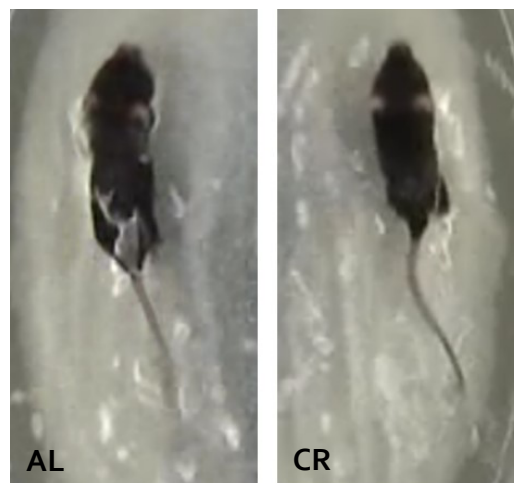


Abb. 14 ApoE-Knockout-Mäuse im Alter von 69 Wochen beim Absolvieren des Morris Water Maze; links nach ad libitum Fütterung (AL), rechts nach kalorienrestriktiver Fütterung (CR)

3.3 Neuronale Genexpression lipolytischer Parameter

Der flache Gewichtsverlauf nach CR spricht für einen Stoffwechsel mit großer kataboler und lipolytischer Komponente. Parameter für eine solche Lipolyse sind der nukleäre Rezeptor PPAR γ und das Zielgen ABCA1. Durch die Analyse der Expressionshöhe im Gehirn können wir weitere Auskunft über den metabolischen Zustand der Mäuse erhalten.

3.3.1 Neuronale PPAR γ -Genexpression

Die relative neuronale mRNA-Expression von PPAR γ der AL-gefütterten Mäuse bleibt nach 4-, 20- und 65-wöchiger Fütterung annähernd auf gleichem Niveau. Bei kalorienrestriktiv gefütterten Mäusen steigt die mRNA-Expression zwischen 4 und 20 Wochen leicht an, fällt jedoch nach 65-wöchiger Fütterung wieder ab. Vergleicht man beide Versuchsreihen miteinander, so stellt man fest, dass eine

CR die mRNA-Expression von PPAR γ nach 4-wöchiger kontrollierter Nahrungsaufnahme um das 1,5-Fache gegenüber AL-gefütterten Mäusen ansteigen lässt. Nach 20 Wochen ist diese sogar signifikant um das 3-Fache erhöht. Nach 65 Wochen gleichen sich die Expressionsspiegel von AL- und CR-gefütterten Mäusen wieder an (Abbildung 15).

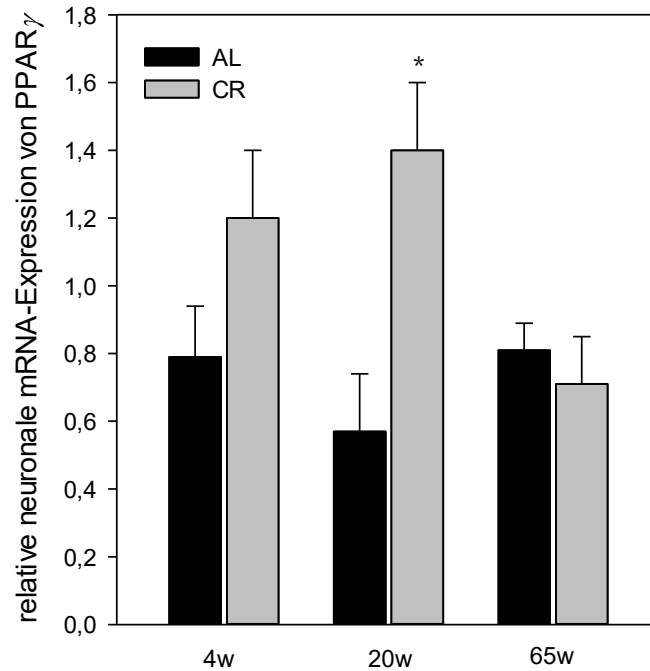


Abb. 15 RT-qPCR; Vergleich der relativen neuronalen mRNA-Expression von PPAR γ bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW \pm SEM; ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p \leq 0,05 vs. AL

3.3.2 Neuronale ABCA1-Genexpression

ABCA1 dient als weiterer Marker für eine lipolytische Stoffwechsellaage und steht unter der Regulation von PPAR γ , da dieses die DNA zur Transkription des Transporters freigibt. Folgend sind die Ergebnisse der RT-qPCR abgebildet (Abbildung 16).

Altersabhängig fällt die relative neuronale mRNA-Expression von ABCA1 kontinuierlich bei AL-Fütterung ab. Die CR-gefütterten Mäuse hingegen zeigen initial nach 4 und 20 Wochen eine gleichbleibende Expression, welche nach 65-wöchiger CR auf 1/3 des vorherigen Wertes abfällt. Im Vergleich mit AL-gefütterten Tieren lässt eine CR die mRNA-Expression von ABCA1 nach 4 und 20 Wochen um ein Drittel ansteigen, während sich nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung beide Expressionsspiegel von AL- und CR-gefütterten Mäusen angleichen.

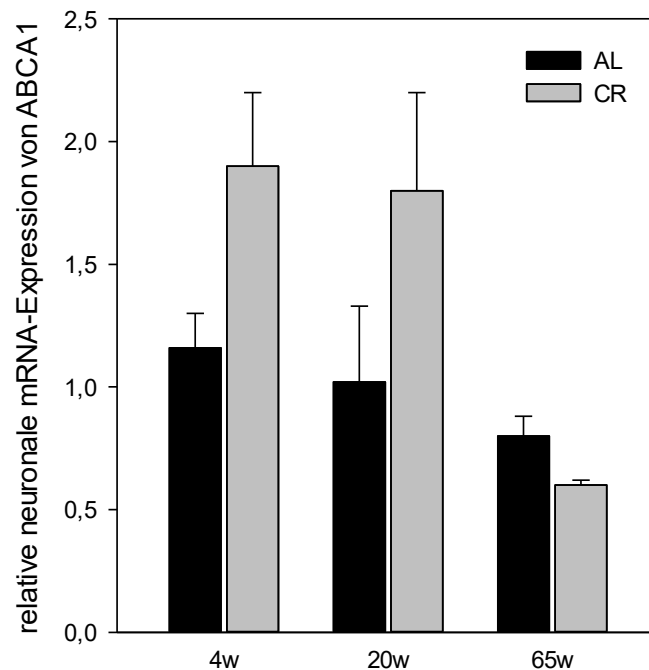


Abb. 16 RT-qPCR; Vergleich der relativen neuronalen mRNA-Expression von ABCA1 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM

3.4 FGF21 in Leber, Blut und ZNS

In der Theorie kommt es durch eine CR zur Steigerung der hepatischen FGF21-Synthese mit anschließender endokriner Sekretion. Ob dies auch in unserer Studie erfüllt wird, wurde durch die Ermittlung der hepatischen Genexpression und der Plasmakonzentration von FGF21 untersucht.

3.4.1 Hepatische FGF21-Genexpression

Die hepatische mRNA-Expression von FGF21 gibt Aufschluss über die Steigerung der Synthese des Faktors bei einer kalorienrestriktiven Diät (Abbildung 17).

Die mRNA-Expressionen von FGF21 der AL-gefütterten Mäuse unterscheiden sich sowohl nach 4- als auch nach 20- und 65-wöchiger Fütterung kaum voneinander und stagnieren auf sehr geringem Expressionsniveau. Die Resultate der Versuchstiere unter CR präsentieren ein anderes Bild: So zeigt sich hier ein altersbedingter Anstieg der FGF21-mRNA-Expression. Demnach steigt diese nach 65-wöchiger CR signifikant gegenüber der 4-wöchigen Fütterung an.

Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf das Potential dieser Nahrungsumstellung zu. Vergleicht man AL- und CR-gefütterte Mäuse miteinander ist die mRNA-Expression der Tiere mit 4-wöchiger Diät

doppelt so hoch wie die der Mäuse mit AL-Fütterung. Nachdem sich die Werte beider Versuchsreihen nach 20 Wochen auf dem gleichen Niveau befinden, ist der Unterschied nach 65 Wochen am größten. Hier ist die Expression der CR-gefütterten Tiere signifikant 13-fach erhöht. Es deutet darauf hin, dass sich eine entscheidende FGF21-Expressionserhöhung erst nach einer CR über 20 Wochen einstellt.

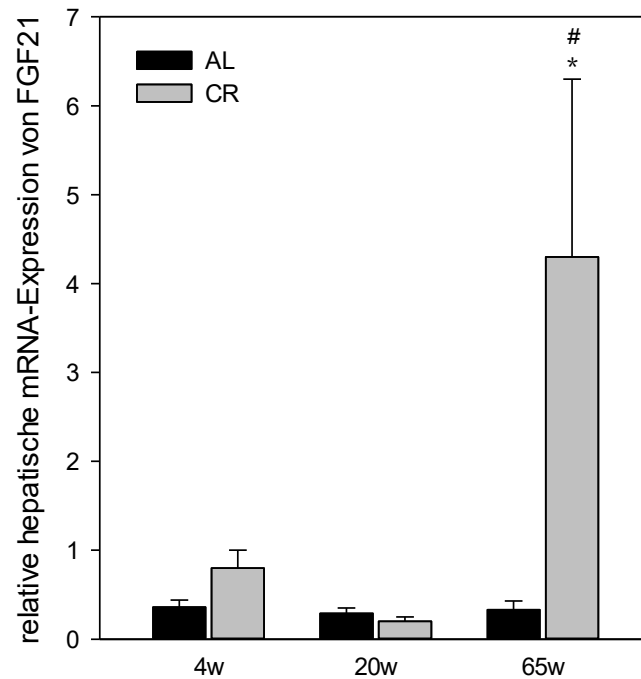


Abb. 17 RT-qPCR; Vergleich der relativen hepatischen mRNA-Expression von FGF21 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM, ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL, #p≤0,05 vs. 4-Wochen-Tiere

3.4.2 Systemische FGF21-Konzentration im Plasma

Nach unserer Annahme sollte nach CR der Versuchsmäuse die FGF21-Konzentration im Plasma – nach hepatischer Synthese – durch endokrine Sekretion ansteigen. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse graphisch aufgetragen.

Der plasmatische FGF21-Spiegel der AL-gefütterten Mäuse stagniert über den gesamten experimentellen Zeitraum um 120 pg/ml ohne signifikante Abweichungen. Nach 8- bis 30-wöchiger CR zeigt sich ein ähnliches Bild mit gleichbleibenden Konzentrationsspiegeln bei circa 120 pg/ml. Jedoch ändern sich diese ab der 40. Lebenswoche. Schlagartig steigt die FGF21-Konzentration signifi-

kant gegenüber den AL-gefütterten Mäusen um über das 3-Fache an und verbleibt in der Folge auf einem Level von circa 350 pg/ml. Dieser Anstieg ist bei den AL-gefütterten Mäusen nicht zu verzeichnen.

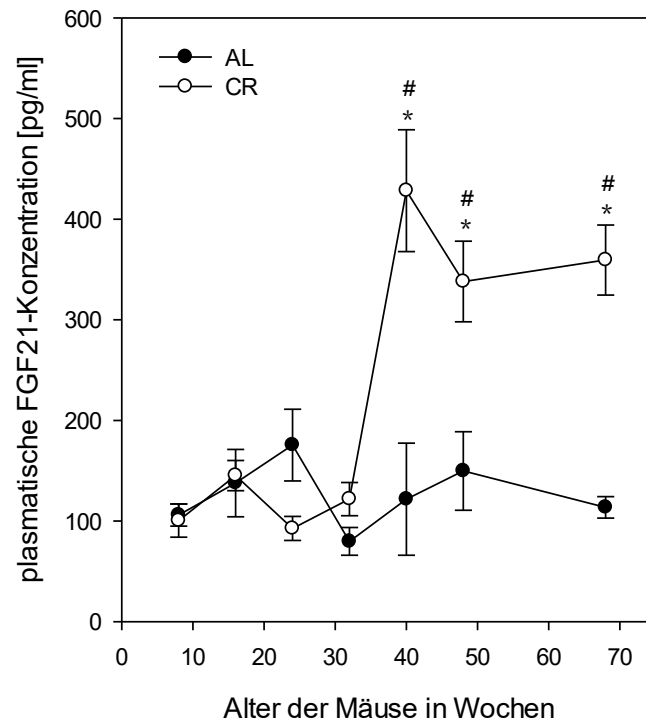


Abb. 18 Sandwich-ELISA: Vergleich der FGF21-Konzentration im Plasma über 69 Lebenswochen bei ApoE-Knockout-Mäusen unter 65-wöchiger kontrollierter ad libitum Fütterung (AL: n=7) und Kalorienrestriktion (CR: n=4); MW±SEM, ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p<0,05 vs. AL, #p<0,05 vs. 8-wöchige Konzentration

3.4.3 Neuronale Akkumulation von FGF21

Für die neuronale Wirkung von endokrinem FGF21 ist die Anwesenheit im Gehirn durch die Passage über die BHS wichtigste Voraussetzung. Dazu wurden immunhistochemische kortikale Schnitte angefertigt (Abbildung 19).

Die Abbildung mit zwei repräsentativen Schnitten zeigt auf der linken Seite eine AL-gefütterte ApoE-Knockout-Maus nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung und auf der rechten Seite das Bild des CR-gefütterten Pendants gleichen Alters. FGF21-positive Zellen sind braun gefärbt und mit Pfeilen exemplarisch markiert.

Während FGF21 bei der AL-gefütterten Maus kaum nachzuweisen ist, finden sich vermehrt positive Signale bei CR-gefütterten Mäusen, vor allem rund um kortikale Gliazellen. Damit ist die Vorausset-

zung erfüllt, dass FGF21 durch kortikale Anreicherungen die Möglichkeit einer neuronalen Wirkung besitzt.

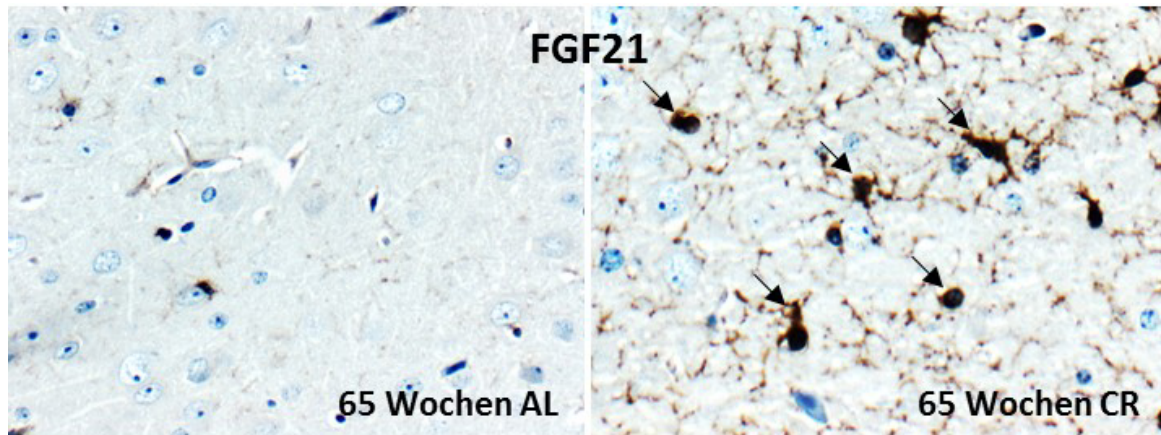


Abb. 19 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Anwesenheit von FGF21 im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL=ad libitum Fütterung, CR=Kalorienrestriktion

3.5 Neuronale Aktivität von FGFR1c, ERK1/2 und AMPK

Gemäß unserer Hypothese der FGF21-Signalkaskade wurden weiterhin die Aktivitäten des Rezeptors FGFR1c und der Zielproteine ERK1/2 und AMPK unter Einfluss von erhöhten FGF21-Spiegeln untersucht.

3.5.1 Expression von pFGFR1c

Als erster Schritt war zu ermitteln, ob sich eine Aktivitätssteigerung vom FGF-Rezeptor 1c einstellt. Dazu wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 20).

In der Abbildung erkennt man zwei Präparate gleicher kortikaler Region einer AL- (links) und einer CR-gefütterten Maus (rechts) nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung. FGFR1c-positive Neuronen sind braun gefärbt sowie exemplarisch mit einem Pfeil markiert. Sie sind in einer höheren Anzahl bei CR-gefütterten Mäusen im Vergleich zu AL-gefütterten Mäusen zu finden. Somit wird veranschaulicht, dass eine lebenslange CR über 65 Wochen mit einer erhöhten Aktivierung/Phosphorylierung vom FGFR1c einhergeht.

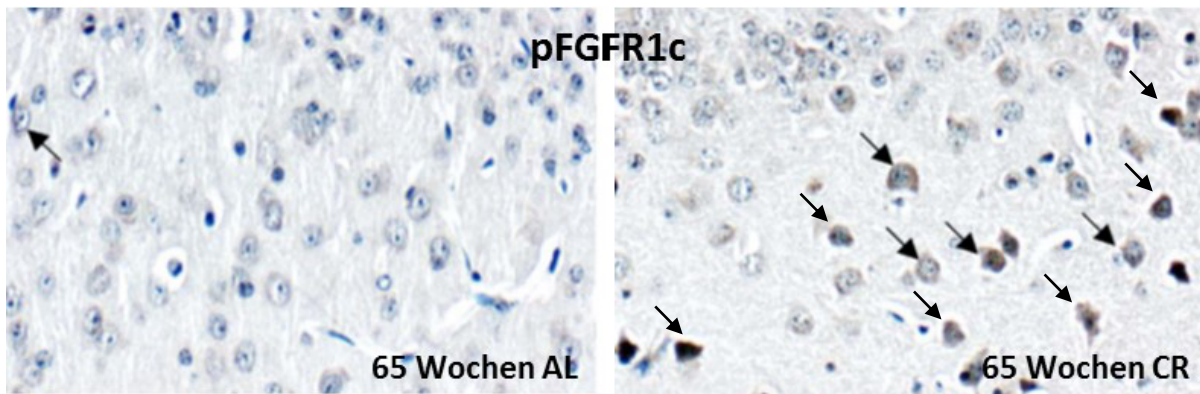


Abb. 20 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von phosphoryliertem FGFR1c im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL=ad libitum Fütterung, CR=Kalorienrestriktion

3.5.2 Expression von pERK1/2

Die Serin/Threonin-Kinasen ERK1 und 2 sind intrazelluläre Signaltransduktoren und unter anderem für die Zellproliferation und -differenzierung zuständig. Als mögliches Glied der FGF21-Kaskade ist durch den resultierenden Abfall an phosphoryliertem Tau ebenfalls eine neuroprotektive Funktion denkbar. Die ERK1/2-Aktivierung könnte aufgrund der Stimulation durch pFGFR1c ausgelöst werden.

In der Abbildung 21 ist zu erkennen, dass Mäuse unter AL-Fütterung über 4 und 20 Wochen einen annähernd gleichen Proteinexpressionsspiegel von pERK1/2 beibehalten, welcher altersbedingt nach 65 Wochen dezent ansteigt. CR-gefütterte Tiere zeigen einen alterstypisch ansteigenden Verlauf der ERK-Aktivierung von 4 nach 20 Wochen, wobei der Expressionsspiegel nach 65 Wochen im gleichen Maße wieder abfällt. Auffällig ist die signifikante Erhöhung der Expression bei CR-gefütterten Mäusen nach 4 Wochen um das 1,5-Fache und nach 20 Wochen um das Doppelte im Vergleich zu den AL-gefütterten Mäusen. Nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung ist wiederum eine Konvergenz beider Aktivitäten erkennbar.

Die Ergebnisse lassen auf eine Induktion der Signalkaskade durch eine – vor allem kurz- und mittelfristige – CR schließen.

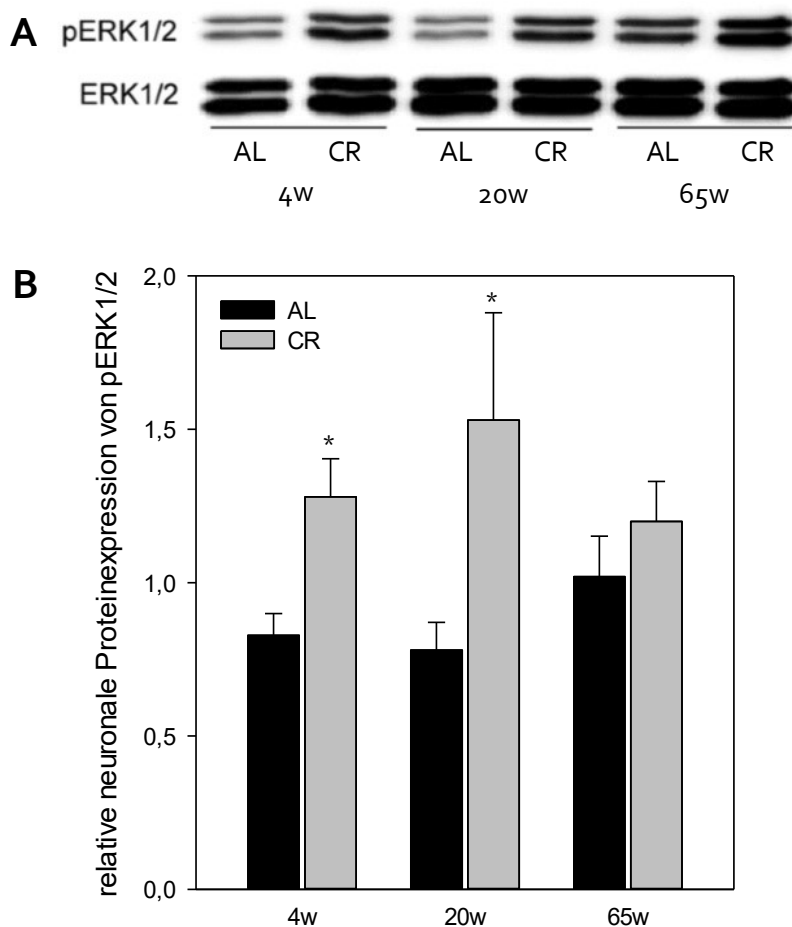


Abb. 21 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pERK1/2 bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM; ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL

3.5.3 Expression von pAMPK

Zur Beurteilung der Aktivität von AMPK wurde die Proteinexpression von pAMPK bei den Versuchsmäusen gemessen und in Relation zum Anteil des nicht-phosphorylierten Proteins gesetzt (Abbildung 22).

Bei AL-gefütterten Mäusen lässt sich im Verlauf ein altersbedingter Abfall der relativen Proteinexpression beobachten. CR-gefütterte Tiere zeigen hingegen ein gleichbleibendes Expressionsniveau nach 4- und 20-wöchiger Diät, welches nach 65 Wochen um circa 30% abfällt. Mäuse unter CR zeigen demzufolge im Vergleich zu AL-gefütterten Tieren insgesamt eine gesteigerte Aktivierung von pAMPK. Vor allem nach 20 Wochen ist die Aktivität um über das 5-Fache erhöht (jedoch nicht signifikant, p=0,058).

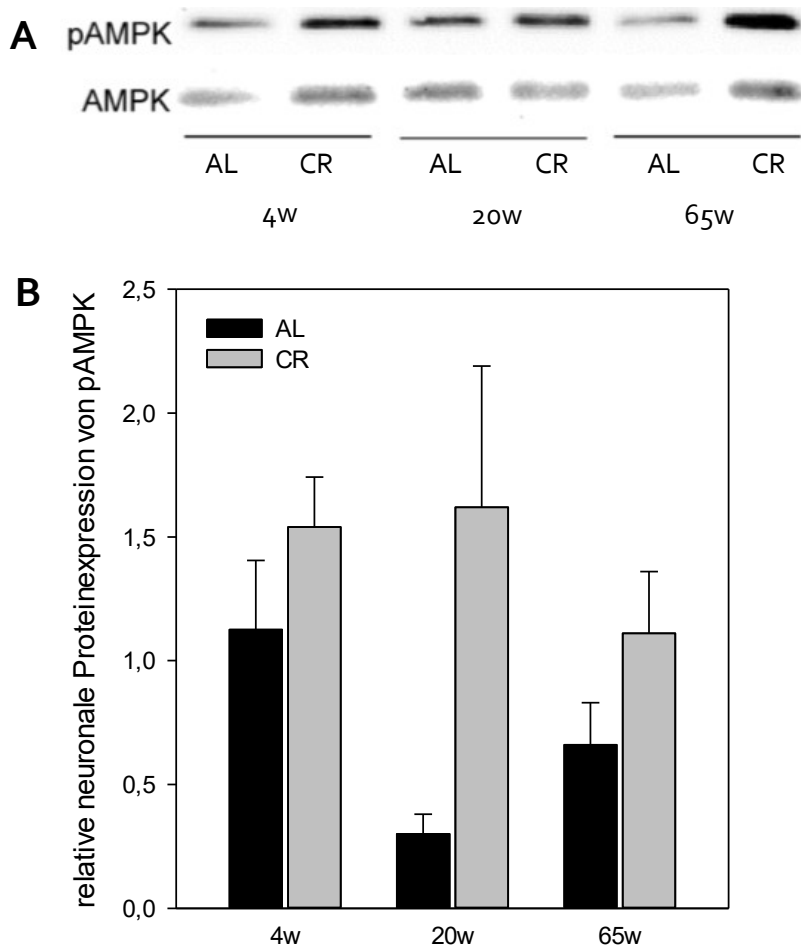


Abb. 22 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pAMPK bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); MW±SEM

3.6 Neuronale Akkumulation von pmTOR und pTau

Man vermutet, pAMPK könne die Aktivierung von mTOR inhibieren, was womöglich zu einer verminderten Phosphorylierung von Tau und damit zur Begrenzung neuronaler Degeneration führt. Daher wurde mithilfe von Immunhistochemie und densitometrischer Analyse die Expression von pmTOR und pTau ermittelt.

3.6.1 Expression von pmTOR

Dem Protein mTOR wird eine entscheidende Funktion bei der Ausbildung von neurodegenerativen Erkrankungen angerechnet. Durch seine Inhibition könnten pathologische Prozesse unterbunden werden. Inwiefern sich eine lebenslange CR auf mTOR auswirkt, zeigt Abbildung 23.

Während die linke Hälfte der Abbildung einen repräsentativen Schnitt einer AL-gefütterten ApoE-Knockout-Maus nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung zeigt, sieht man auf der rechten Seite das analoge Präparat einer CR-gefütterten Maus gleichen Alters. Phosphorylierte mTOR-positive Neurone sind braun dargestellt und beispielhaft mit Pfeilen markiert. Im Vergleich beider kortikalen Hirnschnitte fällt die Reduktion von phosphoryliertem/aktiviertem mTOR seitens der CR-gefütterten Tiere auf. Beim Schnitt der AL-gefütterten Maus finden sich dagegen zahlreiche pmTOR-positive Zellen. Folglich entsteht durch eine lebenslange CR über 65 Wochen eine offensichtliche Inhibition von mTOR.

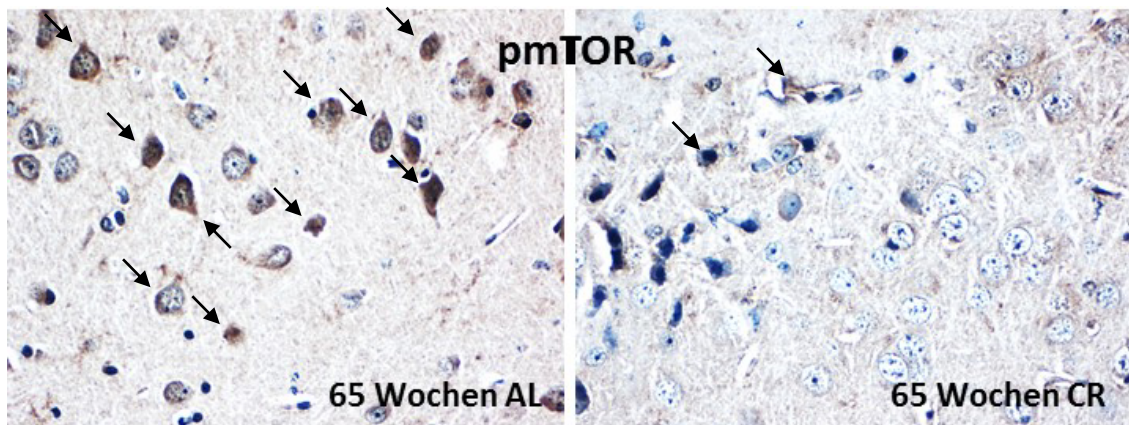


Abb. 23 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von phosphoryliertem mTOR im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit 65-wöchiger ad libitum Fütterung (links) und 65-wöchiger CR (rechts); AL=ad libitum Fütterung, CR=Kalorienrestriktion

3.6.2 Akkumulation von pTau

Die Überphosphorylierung des Tau-Proteins ist entscheidend für die Pathogenität neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere des Morbus Alzheimer. Durch die entstehenden zytoskelettalen Störungen und die Ablagerungen gepaart-helikaler neurofibrillärer Bündel kann es im Verlauf zu kognitiven Funktionseinschränkungen kommen. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der neuronalen Proteinexpression von phosphoryliertem Tau in Relation zur nicht-phosphorylierten Form.

Bei AL-gefütterten Mäusen steigt mit dem Alter die Phosphorylierung von Tau kontinuierlich an und erreicht dabei nach 20 und 65 Wochen einen signifikanten Zuwachs gegenüber den Tieren nach 4-wöchiger Fütterung. Bei CR-gefütterten Mäusen liegt die Proteinexpression von pTau nach 4 Wochen auf sehr niedrigem Niveau, steigt nach 20 Wochen an und stagniert dort nach 65 Wochen. Im Vergleich wird deutlich, dass der Anteil von pTau im Verhältnis zu nicht-phosphoryliertem Tau bei CR-gefütterten Mäusen durchweg etwa halb so groß im Gegensatz zu AL-gefütterten Mäusen gleichen Alters ist. Bei den Ergebnissen der Tiere nach 65-wöchiger kontrollierter Fütterung ist diese Diskrepanz sogar signifikant.

Zusammenfassend ist ein fortschreitender Anstieg der Expression vom phosphorylierten Tau-Protein erkennbar, wobei dieser durch eine CR eingeschränkt oder sogar aufgehalten werden kann.

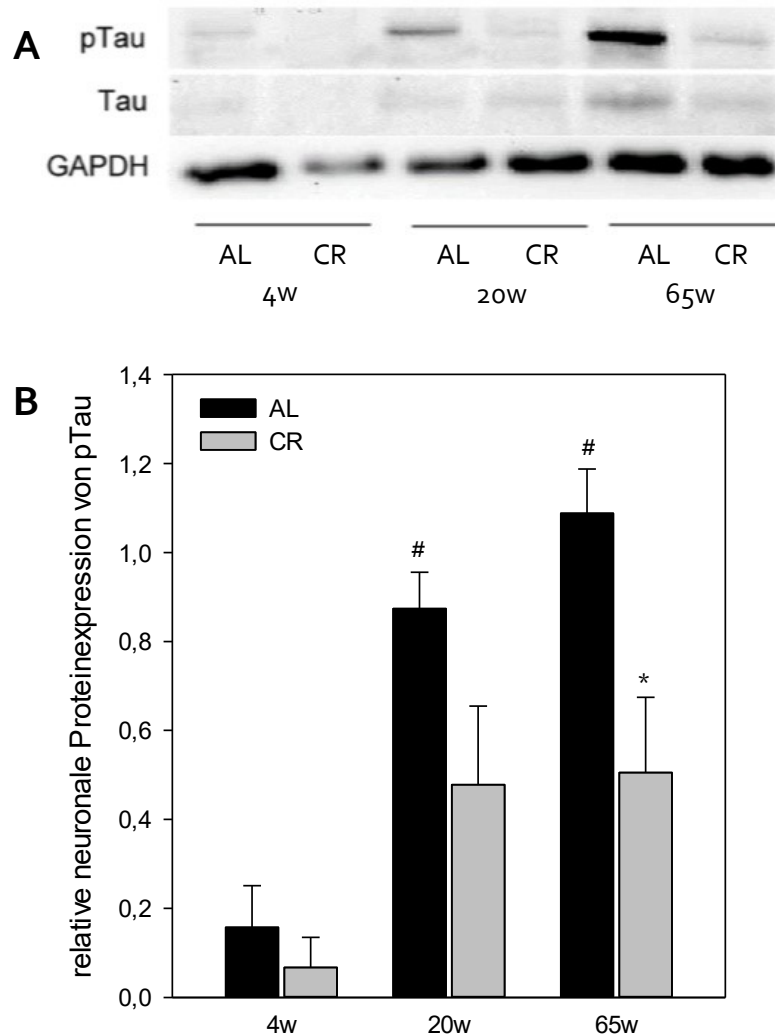


Abb. 24 Semidry-Western-Blot; Repräsentative Blots (A) und densitometrischer Vergleich (B) der relativen neuronalen Proteinexpression von pTau bei ApoE-Knockout-Mäusen nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); 4w=Mäuse mit 4-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n= 10, CR: n=10), 20w=Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=10, CR: n=10), 65w=Mäuse mit 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (AL: n=7, CR: n=4); GAPDH diente als Ladekontrolle; MW±SEM; ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p≤0,05 vs. AL; #p≤0,05 vs. 4-Wochen-Tiere

3.7 Expression vom PSD-95

PSD-95 ist essentiell für die Bildung synaptischer Komplexe. Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer gehen mit einem auffälligen Untergang von PSD-95-positiven Zellen einher, so dass die Synaptogenese nachhaltig gestört wird (73). Abbildung 25 zeigt repräsentative kortikale Schnitte von AL-gefütterten Mäusen (A, C, E) und kalorienrestriktiv ernährten Tieren (B, D, F) nach

4- (A, B) 20- (C, D) und 65-wöchiger kontrollierter Fütterung (E, F). PSD-95-positive Neurone sind braun gefärbt und exemplarisch mit Pfeilen markiert.

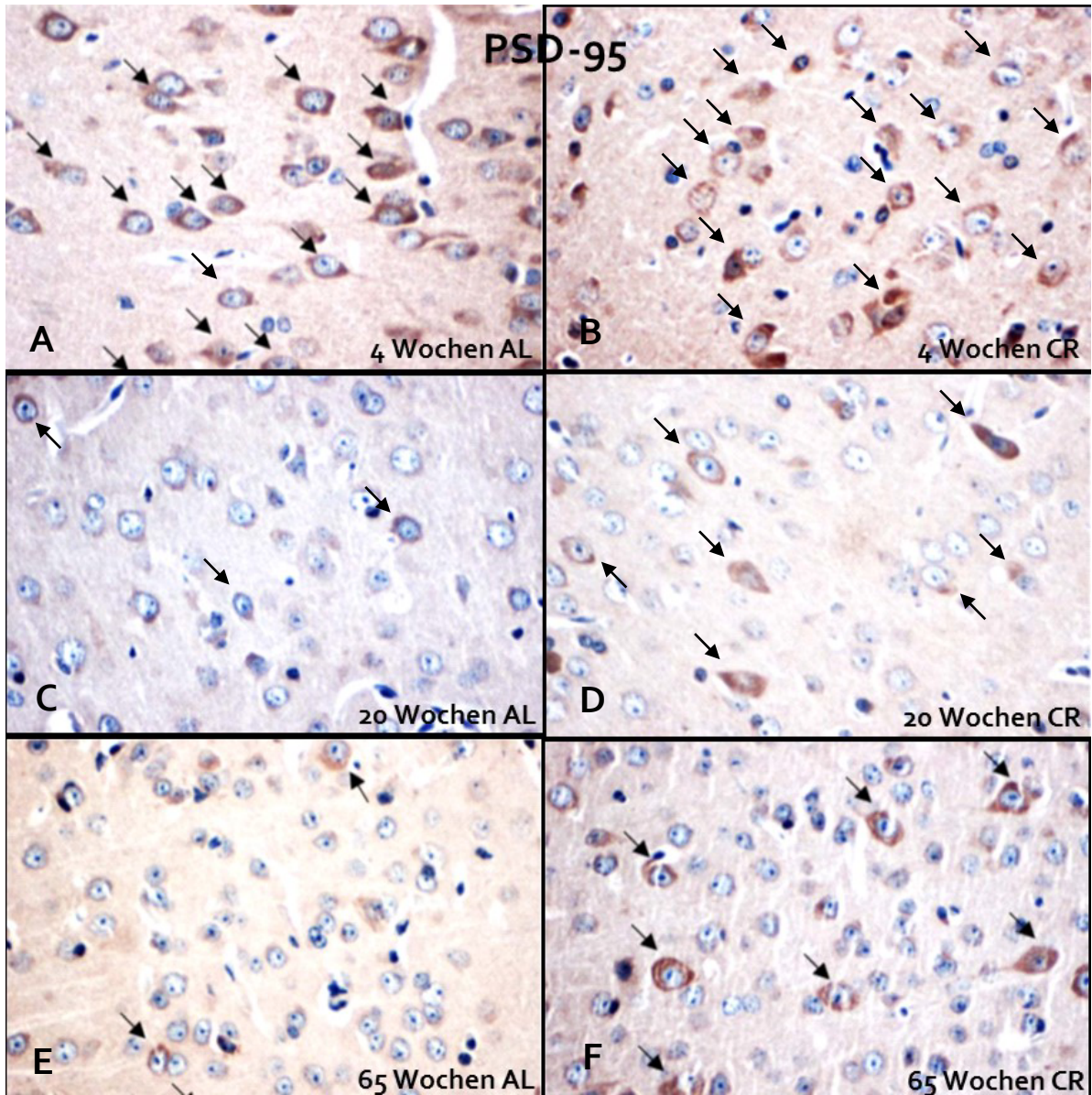


Abb. 25 Repräsentative immunhistochemische Bilder (originale Vergrößerung x400) der Expression von PSD-95 im Gehirn von ApoE-Knockout-Mäusen (Pfeile) mit ad libitum Fütterung (A, C, E) und CR (B, D, F); AL=ad libitum Fütterung, CR=Kalorienrestriktion; A, B: 4-wöchige kontrollierte Fütterung, C, D: 20-wöchige kontrollierte Fütterung, E, F: 65-wöchige kontrollierte Fütterung

Die Ergebnisse der AL-gefütterten Mäuse zeigen eine stetige altersbedingte Reduktion der PSD-95-Expression. Bei CR-gefütterten Tieren ist nach 20 Wochen im Vergleich zu 4 Wochen ebenfalls eine leichte Expressionsreduktion zu erkennen, während nach 65-wöchiger kalorienrestriktiver Fütterung die Expression stabil gehalten wird. Im Vergleich beobachtet man somit bei CR-gefütterten Mäusen im Gegensatz zu AL-gefütterten Tieren nach 65 Wochen eine erhöhte Anzahl von PSD-95-positiven Neuronen.

3.8 Morris Water Maze

Zur Analyse des Ausmaßes der Neurodegeneration wurden die Mäuse im Morris Water Maze getestet. Dieser Test dient mithilfe von mehreren Messvariablen der angemessenen Beurteilung des räumlichen Gedächtnisses.

3.8.1 Zeit bis zur Entdeckung der Zielplattform

Im Vordergrund steht die Zeit bis die PF₄ gefunden wurde, beziehungsweise diese – am Testtag – das erste Mal überquert wurde. Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse für die jeweiligen Versuchstiere.

Die Tiere nach 4-wöchiger AL-Fütterung benötigen am ersten Tag des Morris Water Maze im Mittel etwas über 20 Sekunden, um die Zielplattform (PF₄) zu finden. Durch die Wiederholung des Versuchs verringert sich diese Latenzzeit stetig, bis die Mäuse am letzten Tag nur noch circa 5 Sekunden benötigen, was etwa einem Fünftel der Ausgangszeit entspricht. Bei Tieren unter 4-wöchiger CR ist hierbei kein erwähnenswerter Unterschied im Kurvenverlauf gegenüber 4-wöchiger AL-Fütterung zu erkennen (A).

Auch die Mäuse mit 20-wöchiger kontrollierter Fütterung liefern ein ähnliches Resultat. Bei den AL-gefütterten Tieren liegt der Mittelwert der Zeit bis zum Auffinden der Zielplattform bei 45 Sekunden. In der Folge wird kontinuierlich weniger Zeit benötigt, sodass am letzten Tag durchschnittlich 5 Sekunden erforderlich sind. Für die Mäuse gleichen Alters unter CR sind am ersten Tag im Mittel 28 Sekunden vonnöten, um PF₄ zu entdecken. Unter fortdauernder Abnahme des Kurvenverlaufs sind beim letzten Versuch ebenfalls nur noch etwa 5 Sekunden nötig (B).

Bei Mäusen mit 65-wöchiger AL-Fütterung ist eine höhere Fluktuation der Latenzzeiten über die verschiedenen Tage erkennbar. Sie bedürfen im ersten Versuch durchschnittlich 32 Sekunden, um das Ziel zu erreichen. Am zweiten Tag erhöht sich die Dauer zur Auffindung der PF₄ auf circa 50 Sekunden. Nach erwartetem Abwärtstrend des Kurvenverlaufs bleibt im letzten Versuch eine Dauer von etwa 10 Sekunden. Mäuse mit 65-wöchiger CR benötigen am ersten Versuchstag etwa 50 Sekunden bis zum Ziel. Am vierten Tag wird nach persistenter zeitlicher Verbesserung die Plattform wie auch bei den AL-gefütterten Mäusen bereits nach circa 10 Sekunden erreicht (C).

In keiner der Versuchsreihen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den AL- und den CR-gefütterten Mäusen erkennbar. Jeweils beide Kurven verzeichnen einen gleichförmigen Rückgang der Latenzzeit, was der Anzahl von Wiederholungen und dem damit einhergehenden Lerneffekt der Tiere zu verdanken ist. Lediglich beim zweiten, dritten und vierten Trainingslauf von Mäusen nach 65-wöchiger CR wird die Plattform im Vergleich zu gleichaltrigen AL-gefütterten Mäusen schneller erreicht. Dieser Unterschied wird jedoch am Testtag wieder egalisiert.

Wie bereits erwähnt, steigt bei den Versuchsmäusen mit dem Alter als Ausdruck neurodegenerativer Prozesse die Phosphorylierung von Tau, während die Expression von PSD-95 sinkt. Auch im MWM erkennt man, dass sich mit zunehmendem Alter (unabhängig von AL- und CR-Fütterung) das Ergebnis verschlechtert. So benötigen jüngere Tiere durchschnittlich weniger Zeit zum Auffinden der PF₄ als ältere Artgenossen.

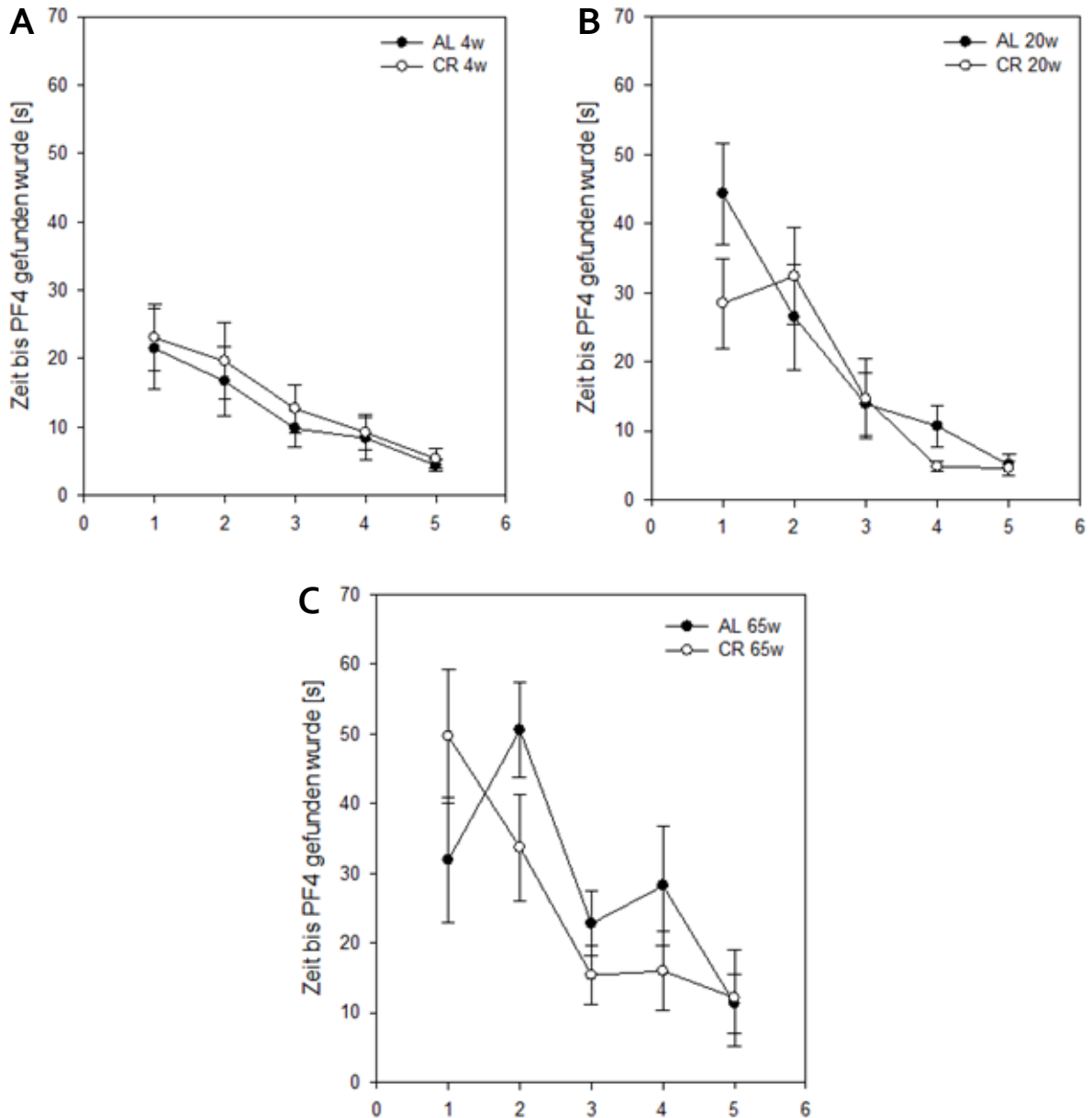


Abb. 26 Morris Water Maze: Vergleich der Latenzzeit bis zum Auffinden der Plattform 4 (PF₄) bei ApoE-Knockout-Mäusen unter ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); die Abszisse beschreibt 5 Durchführungen des Parcours über 4 Versuchstage (an Tag 2 und 3 ist jeweils nur der letzte Durchlauf der Trainingsblöcke aufgeführt); A: kontrollierte Fütterung über 4 Wochen (AL 4w: n= 10, CR 4w: n=10), B: kontrollierte Fütterung über 20 Wochen (AL 20w: n=10, CR 20w: n=10), C: kontrollierte Fütterung über 65 Wochen (AL 65w: n=7, CR 65w: n=4); MW±SEM

3.8.2 Plattform-Querungen am Testtag

Hohe Aussagekraft über das räumliche Gedächtnis hat ebenfalls die Anzahl von Plattform-Überkreuzungen der Maus während des Testtages. Die Ergebnisse werden auf der Abbildung 27 dargestellt.

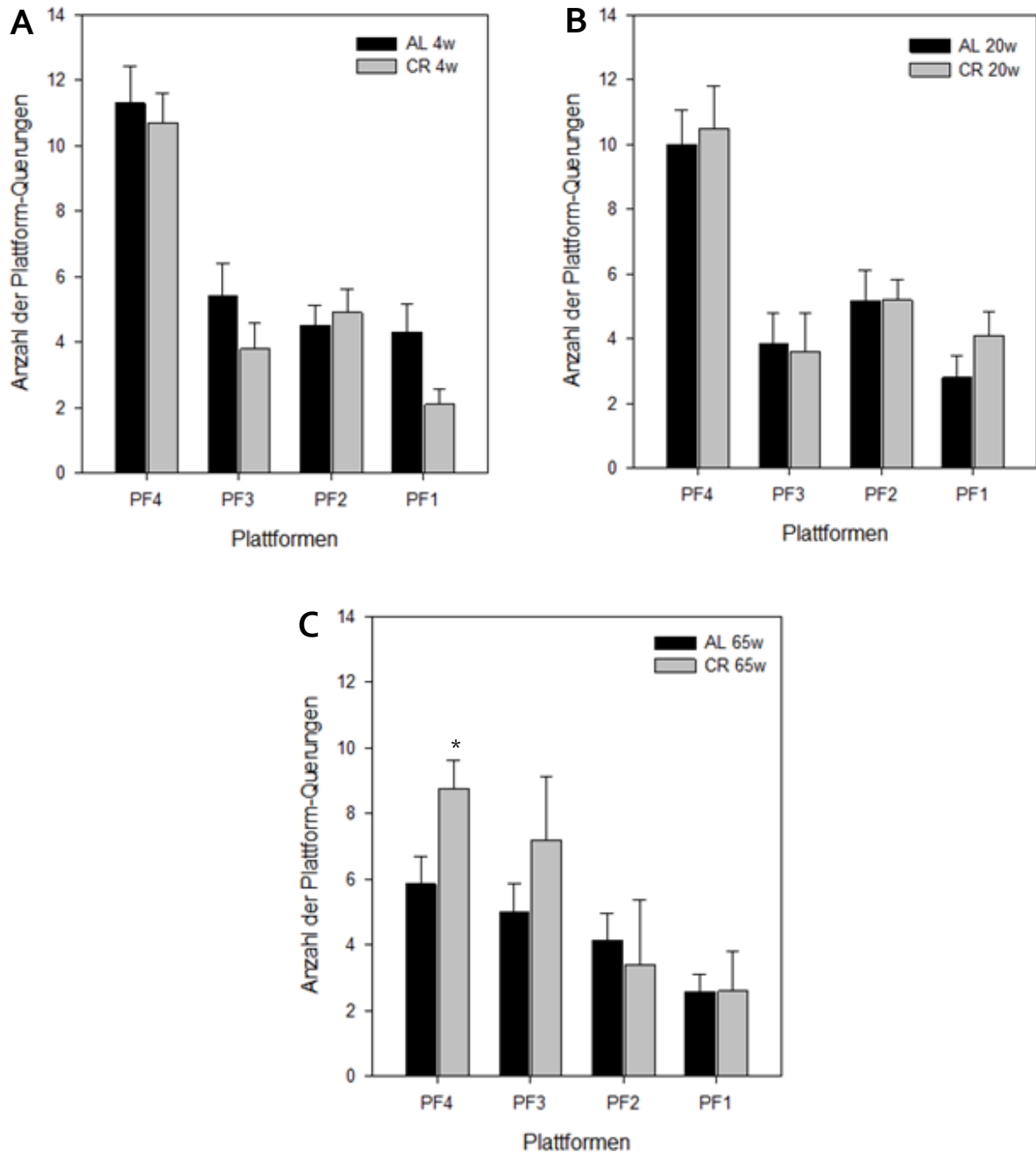


Abb. 27 Morris Water Maze: Vergleich der Anzahl von jeweiligen Plattform-Überkreuzungen der ApoE-Knockout-Mäuse nach ad libitum Fütterung (AL) und Kalorienrestriktion (CR); A: kontrollierte Fütterung über 4 Wochen (AL 4w: n= 10, CR4w: n=10), B: kontrollierte Fütterung über 20 Wochen (AL 20w: n=10, CR 20w: n=10), C: kontrollierte Fütterung über 65 Wochen (AL 65w: n=7, CR 65w: n=4); PF4=Plattform im Zielquadranten (Quadrant 4), PF3=Plattform in der Mitte des dritten Quadranten, PF2=Plattform in der Mitte des zweiten Quadranten, PF1=Plattform in der Mitte des ersten Quadranten; MW±SEM; ANOVA gefolgt vom gepaarten Mann-Whitney-Test: *p<0,05 vs. AL

Die Plattformen 1 bis 3 beschreiben gedachte Plattformen im Zentrum des jeweiligen Quadranten. Da die Plattform 4 vor dem Schwimmen entnommen wurde, beschreibt PF₄ den Ort, an dem sich diese Plattform an den ersten drei Tagen befunden hat. Somit sollte dies das Ziel der Mäuse sein und folglich eine hohe Anzahl von Querungen im Gegensatz zu den anderen festgestellt werden.

Bei den AL-gefütterten Mäusen nach 4-wöchiger kontrollierter Nahrungsaufnahme ist zu erkennen, dass mit ca. 11 Überkreuzungen die Zielpattform (Plattform 4 = PF₄) am häufigsten besucht wird. Die Plattformen 1, 2 und 3 werden im Mittel 4 bis 5 Mal gekreuzt. Mäuse nach 4-wöchiger CR verzeichnen marginal andere Ergebnisse: Während die vierte Plattform ebenfalls etwa 11 Mal überquert wird, geschieht dies bei PF₁, 2 und 3 jeweils zwischen 2 und 5 Mal. Demnach bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen AL- und CR-gefütterten Mäusen (A).

AL-gefütterte Mäuse mit 20-wöchiger Nahrungskontrolle querten die Zielpattform im Mittel 10 Mal. Die restlichen Plattformen werden im Durchschnitt 3 bis 5 Mal überquert. Im Vergleich dazu ist kein bemerkenswerter Unterschied zu den CR-gefütterten Mäusen gleichen Alters festzustellen, bei denen durchschnittlich die gleiche Anzahl von Überkreuzungen beobachtet wird (B).

Interessant ist die Entwicklung nach 65-wöchiger Nahrungskontrolle. Erst in diesem Alter kristallisieren sich erste Unterschiede heraus. Hierbei überqueren im Mittel die AL-gefütterten Mäuse die PF₄ nur 6 Mal. Die restlichen Plattformen werden in absteigender Reihenfolge je etwa 1 Mal weniger überquert. Bei Mäusen gleichen Alters nach CR kann ein anderes Bild beobachtet werden. Die Zielpattform wird durchschnittlich 9 Mal, Plattform 3 im Mittel 7 Mal, PF₂ und PF₁ etwa 2 bis 3 Mal gekreuzt. Vergleicht man AL- mit CR-gefütterten Mäusen, erzielen diejenigen unter CR bezüglich der PF₄-Querungen demzufolge ein signifikant besseres Ergebnis (C).

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Tiermodells

Wir benutzten in unserer Studie weibliche ApoE-Knockout-Mäuse. Das Defizit an ApoE ist mit zahlreichen pathologischen Zuständen assoziiert. So beschrieben Mogadasian et al. unter anderem eine ausgeprägte Dyslipidämie der Mäuse, welche sich mit um 80% verringertem Plasma-HDL, um 400% erhöhtem Plasma-Gesamtcholesterol sowie um 200% erhöhten Plasmatriglyceriden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen äußerte (74). Darüber hinaus stellten sie eine fortgeschrittene Arteriosklerose und eine kürzere Lebenszeit fest (74).

Während unserer Studie kam es im Laufe der experimentellen Phase zu gesundheitlichen Problemen. So entwickelten manche Mäuse im höheren Alter (>30 Wochen) Hautläsionen. Ob diese endogenem Ursprungs oder auf Selbst- beziehungsweise Fremdeinwirkung zurückgingen, ließ sich nicht eruieren. Dementsprechend konnte man nicht mit Sicherheit sagen, ob diese Verletzungen von juckendem Hautausschlag oder aggressivem Verhalten anderer Mäuse (möglicherweise durch neurodegenerative Prozesse) herrührten. Die Behandlung mit Babypuder ermöglichte eine Linderung der Symptomatik. Wurde der Leidensdruck bei bestimmten Tieren zu hoch, wurden diese nach Rücksprache mit dem Tierschutzbeauftragten aus dem Experiment ausgeschlossen und euthanasiert. Die größte Problematik betraf jedoch Tiere im Alter von über 55 Wochen. Sukzessive bildeten sich bei mehreren Versuchsmäusen subkutane tumoröse Verhärtungen unterschiedlicher Ausdehnung. Dies ging im Einzelfall so weit, dass ein Tier mit einer über 1 cm großen Verhärtung am Hinterlauf wegen motorischer Störungen nicht am MWM teilnehmen konnte und aus der Studie ausgeschlossen sowie euthanasiert werden musste. Ein normales Fressverhalten der betroffenen Mäuse wies aber nicht auf Schmerzen hin.

Verglich man die AL- und CR-gefütterten Tieren, unterschied sich außerdem das Verhalten. Insgesamt wirkten die CR-gefütterten Mäuse sehr viel lebendiger und neugieriger, während Tiere ohne CR eher träge waren. AL-gefütterte Mäuse legten ebenfalls ein ängstlicheres und aggressiveres Verhalten zutage.

Des Weiteren gab es Probleme mit dem Überleben der ApoE-Knockout-Mäuse. Von ursprünglich 20 Tieren der 65 Wochen Versuchsreihe überlebten bis zum Ende nur 12. Die Ursachen dafür waren nie eindeutig ersichtlich. Jedoch verstarben sämtliche Mäuse schlagartig ohne jegliche Vorwarnung, was ein Hinweis auf altersbedingte kardiovaskuläre Ereignisse sein könnte. Dies spräche für einen Ausdruck arteriosklerotisch veränderter Gefäße.

Darüber hinaus bilden ApoE-Knockout-Mäuse mit dem Alter zunehmend eine Neurodegeneration aus (40). Masliah et al. bemerkten in diesem Zuge im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine signifikant erniedrigte Expression von Synaptophysin-positiven Zellen im Neocortex und Hippocampus (40). Synaptophysin ist ein integrales Membranprotein mit essentieller Funktion für die Entstehung prä-synaptischer Vesikel, welche als Folge des Verlustes eingeschränkt wird. Weiterhin wurden erniedrigte Expressionslevel von Tubulin α und β beschrieben, welche maßgebliche Bestandteile des Zytoskeletts darstellen (40). Auch eine erhöhte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins wurde festgestellt (75). Durch diesen unlöslichen Zustand entstehen Ablagerungen in Neuronen, welche die Stabilität und Funktionalität des Zytoskeletts negativ beeinflussen. Ferner verursacht der Knockout ausgeprägte synaptische Defekte, welche durch einen Verlust von PSD-95 bis zum Verfall synaptischer Komplexe führen kann (73). Gordon et al. untersuchten in diesem Zusammenhang ApoE-Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Knockout mittels Morris Water Maze. Sie stellten damit bereits 1995 ein eingeschränktes räumliches Gedächtnis fest (76). Bezogen auf unsere Studie ist also möglicherweise auch das beschriebene auffallende Verhalten der AL-gefütterten Mäuse Ausdruck voranschreitender neuronaler Degeneration, welche bei CR-gefütterten Tieren verzögert oder aufgehalten werden konnte.

Demnach existieren offensichtliche Parallelen zwischen dem ApoE-Knockout und neurodegenerativen Erkrankungen.

4.2 Pathologie einer neurodegenerativen Erkrankung

Neurodegenerative Erkrankungen haben sich zu einem omnipräsenten Problem der modernen Welt entwickelt, während es an der vollständigen Aufklärung der Ätiopathogenese weiterhin mangelt. Der Morbus Alzheimer – als populärster Vertreter solcher Erkrankungen – zeichnet sich durch vielerlei Pathologien des Zentralen Nervensystems aus. Unter anderem kommt es – wie auch beim ApoE-Knockout – zur Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins sowie zur Reduktion des postsynaptischen Proteins PSD-95. Ferner sind unter anderem noch inflammatorische und vaskuläre Defizite beschrieben, die eine erhöhte Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen induzieren können. Als Ursprung hierfür werden beispielsweise arteriosklerotische und amyloidogene Veränderungen des Gefäßsystems verantwortlich gemacht (21; 77; 78).

Ein Hauptrisikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen ist das Alter (24). Passend dazu nahm bei den Tieren in unserer Studie mit dem Alter nicht nur das Körpergewicht, sondern auch die Expression von phosphoryliertem Tau zu, während PSD-95 als Marker für synaptische Plastizität altersbedingt abnahm. Neben der unbeeinflussbaren Variable Alter ist das Metabolische Syndrom einer der größten Risikofaktoren zur Ausbildung einer sporadischen AD (79; 80; 81). Bestehend aus

Hypertonie, Dyslipoproteinämie, Glucosetoleranzstörung und Adipositas ist das Metabolische Syndrom durch eine genetische und eine nicht unerhebliche exogene Komponente verursacht. Der zunehmende Lebenswandel zur ungesunden, einseitigen und energiereichen Ernährung bei unzureichender sportlicher Betätigung gilt als wichtiger Auslöser dieser Problematik (82). Auch wenn es an der lückenlosen Erforschung genauer Relationen noch mangelt, ist somit von einer Assoziation beider Krankheitsbilder auszugehen (83).

Sinnvoll ist demzufolge ein differenzierter Blick auf die Zusammenhänge zwischen dem Metabolismus samt Ernährung und dem Ursprung beziehungsweise Verlauf der Alzheimer Erkrankung. Um diese aufzuklären, entschieden wir uns für das Modell des ApoE-Knockouts. Da ein ApoE-Knockout durchaus mit dem natürlichen Apo ϵ_4 -Polymorphismus vergleichbar ist, imitiert dieses Modell im weitesten Sinne die Pathogenese der sporadischen Form der Alzheimer Erkrankung mit kognitivem Fähigkeitsverlust (84; 85). Durch die neurodegenerativen Veränderungen könnte ein differenzierter Blick auf molekularbiologische Prozesse und dementielle Dysfunktionen geschaffen werden (84; 85).

4.3 Auswirkungen der CR

Als gesichert gilt, dass sich eine CR auf vielerlei Art und Weise protektiv auf den Körper auswirkt. Dies gilt sowohl für das kardiovaskuläre System als auch für die generelle Lebenszeit (86; 87; 88). In unserer Studie war es vor allem durch den veränderten Habitus ersichtlich. Dazu gehörte bei CR-gefütterten Mäusen – im Vergleich zu Mäusen mit freiem Zugang zur Nahrung – ein Gewichtsverlauf mit deutlich reduziertem Anstieg. Jüngste Forschungen an Tieren und Menschen zeigten weiterhin, dass die Reduktion von Kalorien den Altersprozess des Gehirns verlangsamt und die kognitiven Fähigkeiten – auch bei altersabhängigen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer – verbessert (88; 89). So zeigten Kuhla et al. bei C57BL/6-Mäusen unter lebenslanger CR im Vergleich zu Kontrollmäusen ein verbessertes räumliches Gedächtnis (68). Zur Ermittlung diente dabei das MWM. Dieses gilt als valides Experiment, um räumliches Lernen und die Fähigkeit des Gedächtnisses zu testen, weshalb es häufig bei Tieren zum Nachweis kognitiver Einschränkungen genutzt wird (90). Des Weiteren beschrieben Adams et al. eine Verzögerung der altersassoziierten Reduktion der synaptischen Plastizität nach CR (91). Möglicherweise hängt diese neuronale Wirkung mit der Induktion der Ketogenese zusammen, welche der konstanten Energieversorgung des Gehirns dient. Den daraus entstehenden Energieträgern, den Ketonkörpern, werden nämlich ebenfalls neuroprotektive Auswirkungen nachgesagt (92). Auch bezüglich der Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins wird ein Benefit durch 2-Desoxyglucose beschrieben, einem Kohlenhydrat, welches eine CR nachahmt (93). Genaue Mechanismen sind momentan noch nicht ganz verstanden, jedoch zeigt dies den maßgeblichen Einfluss von Ernährung auf neuronale Prozesse auf.

Metabolisch bedient sich der Körper zur Energiegewinnung bei einer CR oder beim Fasten der Lipolyse mittels β -Oxidation, um das Zellüberleben sicherzustellen (64). In der Leber wird dies vor allem über PPAR induziert (65; 94). In unserer Studie konnten diesbezüglich neben dem veränderten Habitus lipolytische Prozesse im Gehirn festgestellt werden. Vor allem nach kurz- und mittelfristiger CR erhöhten sich die neuronalen Expressionen von PPAR γ und seinem Zielprotein ABCA1. Das Konvergieren der Expressionsspiegel der AL- und CR-gefütterten Tiere nach 65 Wochen wurde vermutlich durch physiologische Adaptationen an das eingeschränkte Nahrungsangebot seitens der Mäuse unter CR-Fütterung hervorgerufen. Sowohl ABCA1 als auch PPAR γ werden zusätzlich protektive Eigenschaften im Hinblick auf die Pathogenese der Alzheimer Erkrankung zugesprochen. ABCA1 ist nämlich für die posttranskriptionelle Modifikation von ApoE zuständig (38). PPAR γ ist als intrazellulärer Rezeptor unter anderem für die Synthese von ApoE notwendig (33). ApoE ist nachweislich an der Clearance von A β beteiligt, weshalb durch dessen erhöhte Synthese einer bedeutsamen Pathologie der AD entgegengewirkt werden könnte (37). In diesem Zuge stellte die Arbeitsgruppe um Mandrekar-Colucci eine Stimulation der Degradation von A β nach Pioglitazongabe, einem PPAR γ -Agonisten, bei APP/PS1-Mäusen fest (95). APP/PS1-Tiere haben einen Defekt im Sekretaseprozess der amyloidogenen Spaltung, was zu einer erhöhten Aggregation von Amyloidplaques führt (96). Falls ein ApoE-Knockout zur Amyloidplaquebildung führt, könnten folglich PPAR γ und ABCA1 eine neuroprotektive Alternative zum in dieser Studie untersuchten potentiellen neuronalen Benefit durch den AMPK-Pathway sein.

Eine weitere Folge der CR ist der Expressionsanstieg von FGF21 (65). Dieser Faktor dient unter anderem der Kommunikation zwischen Leber und Fettgewebe hinsichtlich metabolischer Prozesse sowie der metabolischen Adaptation des Organismus auf Fastenperioden (55; 97). Die Wirkung geht dabei aus der Aktivierung des bevorzugten Rezeptors FGFR1c hervor (98). Im vorliegenden Experiment ist ebenfalls ein signifikanter Expressionsanstieg von hepatischem FGF21 nach langfristiger CR zu verzeichnen. Als Folge der endokrinen Sekretion erhöht sich auch ab etwa 40 Wochen die Konzentration des Faktors im Blut signifikant bei Mäusen mit kalorienrestriktiver Ernährung. Endokrin sezerniert gelangt FGF21 intravasal zu peripheren Adipozyten und induziert dort die Lipolyse durch beispielsweise die Regulation von PPAR α/γ und Induktion der β -Oxidation. Zusätzlich wird in der Leber zur Energiegewinnung die Gluconeogenese und die Ketogenese aktiviert (57; 99; 64; 100). Außerdem führt der Faktor zur Reduktion einer Glykämie bei Typ-2-Diabetes, was wahrscheinlich mit der Erhöhung der Insulinsensitivität und der vermehrten Expression des Insulinrezeptors IRS-1 zusammenhängt (55; 57; 59; 101). Ebenso kann durch einen erhöhten FGF21-Serumspiegel eine Dyslipidämie gebessert werden, womit ein weiteres Kardinalsymptom des Metabolischen Syndroms behandelt werden könnte (55). Möglich ist dies aufgrund einer erhöhten Glucoseaufnahme in Adipozyten durch die vermehrte Expression des Transporters GLUT-1 (101). Darüber hinaus ist bekannt, dass

FGF21 durch die Induktion eines erhöhten Energieumsatzes zu einem Gewichtsverlust führt (57; 100). Daher erscheint es paradox, dass adipöse Menschen und Nager einen erhöhten FGF21-Serumspiegel ausweisen. Begründet wird dies durch eine FGF21-Resistenz, welche aus einem Mangel des Co-Rezeptors β -Klotho resultiert. Dieser ist für die Aktivierung der FGF-Rezeptoren und somit den Effekten von FGF21 obligat. Bei einer Adipositas könnte der Körper also kompensatorisch die FGF21-Expression erhöhen (57). Bezüglich des Metabolischen Syndroms blieben jedoch bisherige therapeutische Bemühen mit langfristiger Gabe von nativem FGF21 in Studien aufgrund einer schlechten Pharmakokinetik aus (57).

Als weitere protektive Eigenschaft verringert FGF21 inflammatorische Prozesse in doppelter Hinsicht. Einerseits beschrieben Yinhang et al. sowohl eine Inhibition der Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ) durch die Deaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B als auch eine gesteigerte Synthese des antiinflammatorischen Interleukin-10 nach FGF21-Exposition von Makrophagen (102; 103). Dabei reduzierte FGF21 ebenfalls die Synthese von ROS und die Ausbildung von oxidativem Stress (102). Andererseits hat FGF21 indirekt durch die Reduzierung des Körpergewichts mit zusammenhängenden inflammatorischen Prozessen eine antiinflammatorische Wirkung (103; 104).

Wichtig für unsere Studie war es, dass FGF21 die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (62). Somit besitzt der Faktor das Potential, neuronal wirken zu können, obwohl er im ZNS kaum synthetisiert wird. Auch wenn die dortige Funktion nicht vollends aufgeklärt ist, gibt es Hinweise auf die protektive Rolle bei zentralnervösen Degenerationen (105). So stellten beispielsweise Sa-Nguanmoo et al. bei Ratten nach einer Exposition von humanem FGF21 eine erhöhte hippocampale synaptische Plastizität sowie eine vermehrte Dichte dendritischer Dornenfortsätze fest, was sie als Prävention vor kognitivem Verfall werteten (105). Hinzu kommt, dass durch FGF21 dem vermehrten oxidativen Stress bei neurodegenerativen Erkrankungen entgegengewirkt werden könnte, was auf einen resultierenden neuroprotektiven Effekt schließen lässt (26; 102). Wie genau diese Prozesse ablaufen bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung.

FGF21 hat auch Einfluss auf den zentralen beziehungsweise neuronalen Metabolismus. Bookout et al. beschrieben einen Anstieg von systemischen Glucocorticoiden, eine Reduktion der physischen Aktivität und eine Veränderung der zirkadianen Rhythmik in transgenen Mäusen mit erhöhter FGF21-Expression (63). All diese Merkmale sind Bestandteil einer Adaptation auf eine Hungerperiode.

In unseren Versuchen wurde nach 65-wöchiger CR eine erhöhte Akkumulation von FGF21 in kortikalen Gliazellen festgestellt. Es besteht also ein begründeter Hinweis, dass es durch eine gesteigerte

hepatische Synthese zu einer vermehrten Anflutung und Wirkung von FGF21 mithilfe der Passage über die Blut-Hirn-Schranke kommen kann (49).

FGF21 wirkt bevorzugt über den Rezeptor FGFR1c, welcher im Gehirn großzügig vorhanden ist (98; 63). Wie unsere Studie zeigt, haben auch wir phosphorylierten FGFR1c in neuronalen Zellen nach 65-wöchiger CR nachgewiesen. Eine Phosphorylierung durch FGF21 aktiviert den Rezeptor, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden (98). *In vitro* wurde dies durch den Nachweis von vermehrtem pFGFR1c und der erhöhten Anwesenheit von AMPK nach FGF21-Exposition in Gliazellen bestätigt (106). Ebenso beschrieben weitere Autoren AMPK als ein Zielprotein von FGF21 (61; 60). So stellten sie in diesem Zusammenhang fest, dass eine FGF21-Behandlung zur erhöhten Phosphorylierung von AMPK in Adipozyten führt (61). Die Phosphorylierung von AMPK könnte direkt durch den FGFR1c erfolgen. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass diese durch die Kinase ERK1/2 stattfindet. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass einerseits FGF21 zu einer ERK1/2-Aktivierung in Leber, Fettgewebe und Pankreas führt (59; 107; 100). Andererseits ist es ERK1/2 möglich, AMPK zu phosphorylieren (108). Demnach wären beide Kaskaden denkbar. Da diese Pathways in peripherem Gewebe von verschiedenen Autoren beschrieben wurden, vermuteten wir, dass sie ebenfalls auf neuronaler Ebene stattfinden könnten.

So stellte sich in unserer Studie nach 4- und 20-wöchiger CR tatsächlich eine signifikante Steigerung der neuronalen Expression von ERK1/2 ein. Im Hinblick auf die neuronale Expression von pAMPK konnten wir nach 4-, 20-, und 65-wöchiger CR im Vergleich zu den AL-gefütterten Mäusen ebenso eine Steigerung feststellen. Die zunehmende Aktivierung von AMPK durch endokrines FGF21 kann jedoch erst nach 65 Wochen erwartet werden, weil der FGF21-Plasmaspiegel zu einem früheren Zeitpunkt noch nicht angestiegen ist. Demzufolge könnte auch ein Energiemangel per se für die erhöhte Phosphorylierung nach 4 und 20 Wochen verantwortlich sein. Denn es ist bekannt, dass eine hohe AMP/ATP-Ratio physiologisch die Aktivierung von AMPK induziert (43). Inwiefern nun FGF21 oder der Energiemangel ausschlaggebend für die vermehrte Expression von pAMPK nach 65 Wochen verantwortlich ist, kann nur spekuliert werden. Sicher ist aber, dass FGF21 über den Rezeptor FGFR1c das Potential hat, AMPK zu phosphorylieren beziehungsweise zu aktivieren (61; 98).

Die phosphorylierte AMPK inhibiert mTOR (44). Immunhistochemisch konnten auch wir nach 65-wöchiger CR eine erniedrigte Expression von pmTOR beobachten. Der Effekt einer mTOR-Hemmung stellt möglicherweise einen wichtigen Zusammenhang zwischen Ernährung, Metabolismus und neuronaler Protektion dar. Studien haben gezeigt, dass mit der Inhibition eine Reduzierung von hyperphosphoryliertem Tau einhergeht, was zur Folge hat, dass sich weniger neurotoxische Aggregate (beispielsweise NFTs) ablagern (47). Phosphoryliertes Tau spielt eine große Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimer (18). Somit eignet es sich gut als molekularbiologischer Marker

der neuronalen Degeneration. In unserer Studie wurde bereits ab einer 4-wöchigen CR die zunehmende Phosphorylierung des Tau-Proteins inhibiert, während die relative Menge an pTau bei AL-gefütterten Mäusen stetig mit dem Alter zunahm. Ab der 65. Woche wurde der Unterschied signifikant. Nach langfristiger CR könnte diese pTau-Reduzierung also auf die Inhibition des mTOR durch pAMPK infolge der Steigerung endokriner Sekretion von FGF21 zurückgehen. Die positiven Effekte einer CR nach 4 und 20 Wochen könnten auf die Aktivierung von AMPK aufgrund des Energiemangels mit anschließender mTOR-Hemmung zurückzuführen sein (43; 44).

Analog dazu entwickelten Ma et al. eine weitere alternative Hypothese. Es wurde herausgefunden, dass eine Nahrungsrestriktion zur Aktivierung des Anti-Aging-Gens SIRT1 beiträgt, welches eine Hemmung von mTOR zur Folge hat. Sie spekulierten, dass dieser Pathway beim neuroprotektiven Effekt einer CR involviert ist (109). Hinzu kommt, dass Guo et al. feststellten, dass SIRT1 über die Modulation von mTOR zum Wachstum und Überleben von Neuronen im ZNS beiträgt (110).

Neben der Reduktion von pTau ist die Hemmung von mTOR auch mit einer gesteigerten Synthese von PSD-95 und der damit bedingten Neuroprotektion assoziiert (45). PSD-95 ist essentieller Bestandteil der Postsynapse und Marker für synaptische Plastizität. ApoE-Knockout-Mäuse weisen einen erhöhten Verlust des Proteins im Alter auf, was zur eingeschränkten Ausbildung synaptischer Komplexe führt (41). In unserem Experiment lassen CR-gefütterte Tiere vor allem nach 65 Wochen eine starke Verzögerung des altersassoziierten Abbaus von PSD-95 erkennen. Es ist also von einer erhöhten neuronalen Plastizität infolge einer CR auszugehen, was sich auch durch ein verbessertes räumliches Gedächtnis im MWM bemerkbar machte.

Mittels MWM wurde eruiert, inwiefern sich die molekularbiologischen Ergebnisse in der Gedächtnisleistung und der Funktionalität hippocampaler Hirnareale widerspiegeln. Nach unserer Hypothese müsste der Niedergang kortikaler Neurone infolge der ApoE-Defizienz mit einem schlechteren Ergebnis im MWM einhergehen, da wichtige (vor allem hippocampale) Strukturen im Gehirn der Maus degenerativ verändert vorliegen. Dies wurde auch unter anderem von den Autoren Oitzl et al. 1997 in deren Studie festgestellt: Während Mäuse mit einer heterozygoten ApoE-Defizienz keine Probleme beim Lösen des Tests hatten, schwammen homozygote Mäuse ziellos umher, ohne einen merklichen räumlichen Lerneffekt (111).

Bezogen auf unsere Studie war im MWM vor allem der altersbedingte Abbau der kognitiven Funktionen der Tiere auffällig. So schnitten ältere Mäuse schlechter ab als ihre jüngeren Artgenossen. Beim Vergleich zwischen AL- und CR-gefütterten Mäusen gleichen Alters waren bei der Latenzzeit bis zum Auffinden der Zielplattform keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Betrachtete man jedoch die Anzahl an Zielplattform-Querungen, fiel eine signifikante Erhöhung nach 65-

wöchiger CR auf. Dies könnte Ausdruck der Einschränkung des kognitiven Verfalls und der Verbesserung der räumlichen Gedächtnisleistung infolge einer CR sein.

Insgesamt liefern unsere Ergebnisse also Hinweise auf die durch FGF21 hervorgerufene Signalkaskade zur neuronalen Protektion nach langfristiger CR. Auch wenn es sich dabei um Hypothesen handelt, erscheinen die funktionserhaltenden Effekte durch die oben genannten Faktoren plausibel.

4.4 Schlussfolgerung

Die Pathogenese des Morbus Alzheimer besteht aus komplexen, nicht vollständig geklärten Zusammenhängen. Dementsprechend ist in naher Zukunft nicht von der einen die Ursache bekämpfenden Behandlung gegen diese Krankheit auszugehen. Trotz dessen liefert diese Studie einige Belege für verantwortliche Signalkaskaden, um den pathophysiologischen Prozessen dementieller Erkrankungen vorzubeugen. In Bezug auf unsere anfängliche Annahme (Abb. 8) konnten wir einige molekularbiologische Pathways nach CR bestätigen:

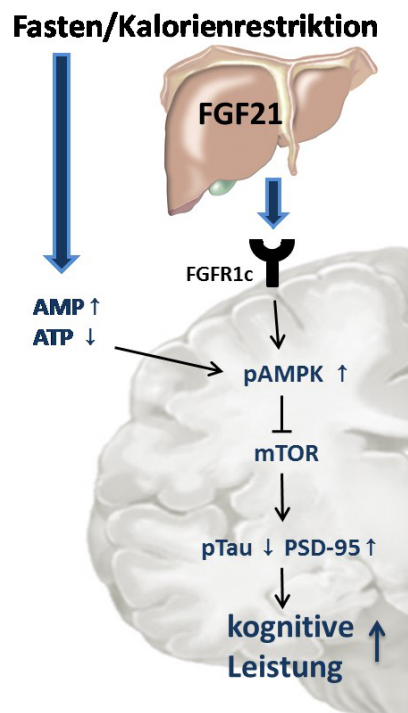


Abb. 28 FGF21-Pathway nach Kalorienrestriktion

Eine langfristige CR führt in ApoE-Knockout-Mäusen zu einer Zunahme von FGF21 sowohl im Blutkreislauf als auch neuronal. Dies führt zu einer vermehrten Aktivierung des bevorzugten Rezeptors FGFR1c im Gehirn. FGFR1c (und/oder der niedrige Energielevel infolge der CR) führt zur Phosphorylierung von AMPK. Es resultiert eine Hemmung von mTOR, in dessen Folge eine reduzierte Hyperphosphorylierung von Tau und eine vermehrte Akkumulation von PSD-95 beobachtet werden kann.

Grundsätzlich kann dadurch dem altersassoziierten Abbau kognitiver Fähigkeiten entgegengewirkt werden.

Neben einer Vielzahl anderer Faktoren übernimmt also FGF21 eine mögliche Schlüsselrolle bei kalorienrestriktiv induzierten Signalkaskaden. Weitere Forschung wird nötig sein, um zu evaluieren, ob er nachhaltig als therapeutisches Target beim Menschen geeignet sein wird.

Letztlich hängt es aber zu einem nicht unerheblichen Teil vom Menschen selbst ab, sich durch Lebensgewohnheiten, Ernährung und Sport um seine Gesundheit zu bemühen.

5 Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen, wie der Morbus Alzheimer, sind weltweit verbreitet und geben Ärzten bei der therapeutischen Behandlung aufgrund fehlender Erforschung der genauen Ätiopathogenese fortwährend Rätsel auf. Unter anderem gehen diese Krankheitsbilder mit einem neuronalen und synaptischen Untergang, einer Überphosphorylierung von Tau und einer Einschränkung kognitiver Fähigkeiten einher (21). Es werden mitunter zunehmend Verkettungen zum Metabolismus des Körpers geknüpft. Stoffwechselstörungen (zum Beispiel das Metabolische Syndrom) können dabei negative Auswirkungen auf diese Krankheiten provozieren (10). In diesem Zusammenhang scheint eine CR mittels hepatischer Synthesesteigerung von FGF21, welcher die Blut-Hirnschranke überwinden kann, über die Zielproteine ERK1/2, AMPK und mTOR einen neuroprotektiven Effekt auf degenerative Prozesse zu haben (59; 61; 62). Dieser Einfluss des FGF21 wird mit der vorliegenden Arbeit untersucht.

ApoE-Knockout-Mäuse, welche eine ausgeprägte neuronale Degeneration ausbilden, wurden über 4, 20 oder 65 Wochen entweder ad libitum oder kalorienrestriktiv ernährt. Während der Versuchszeit wurde alle 4 Wochen via retrobulbärer Blutentnahme und ELISA die Plasmakonzentration von FGF21 gemessen. Anschließend folgte ein Morris Water Maze zur Evaluation des räumlichen Gedächtnisses der Tiere. Durch Gehirn- und Leberextraktion konnte daraufhin das Gewebe mithilfe von Genexpressionsanalysen, Proteinanalysen und Immunhistochemie im Hinblick auf den hypothetischen Pathway, welcher durch FGF21 angestoßen wird, untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine signifikante Erhöhung der FGF21-Plasmakonzentration erst bei einer circa 40-wöchigen kalorienrestriktiven Fütterung eintritt. Kohärent dazu wirkt sich die CR nur nach 65-wöchiger Diät signifikant positiv auf das räumliche Gedächtnis aus, nicht jedoch nach 4 oder 20 Wochen. Auf immunhistologischer Ebene lässt sich ebenfalls neuronal eine erhöhte Aktivität des von FGF21 im Gehirn präferierten Rezeptors FGFR1c sowie eine vermehrte Aktivierung des Zielproteins AMPK feststellen. Außerdem kann ein Rückgang der Überphosphorylierung von Tau und als Marker synaptischer Plastizität eine Zunahme des postsynaptischen Proteins PSD-95 nachgewiesen werden. Durch die weiteren Ergebnisse lässt sich unter Berücksichtigung anerkannter Publikationen folgende Kaskade nachvollziehen: $\text{FGF21} \rightarrow \text{pFGFR1c} \rightarrow \text{pAMPK} \dashv \text{mTOR} \rightarrow \text{pTau} \downarrow + \text{PSD-95} \uparrow$. Folglich besitzt eine CR mit FGF21 als mögliches Schlüsselprotein das Potential einer neurodegenerativen Erkrankung entgegen zu wirken. Jedoch ist im Hinblick auf FGF21 als therapeutisches Target weitere Forschung notwendig.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. **M. J. Prince, A. Wimo, M. M. Guerchet, G. C. Ali, Y.-T. Wu, M. Prina.** The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *The World Alzheimer Report 2015*. 2015.
2. **M. Prince, R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, C. P. Ferri.** The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*. 2013, Bd. 9, 1, S. 63-75.
3. **S. S. Theander, L. Gustafson.** Publications on dementia in Medline 1974-2009: a quantitative bibliometric study. *International journal of geriatric psychiatry*. 2013, Bd. 28, 5, S. 471-478.
4. **J. Gaugler, B. James, T. Johnson, K. Scholz, J. Weuve.** 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's Association*. 2015, Bd. 11, 3, S. 332-384.
5. **Schweiger, H.-D.** Alzheimer: Antidementiva gegen den schleichenden Abbau. *Pharmazeutische Zeitung*. 2008, 34/2008.
6. **M. Ng, T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E. C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S. F. Abera, J. P. Abraham, N. M. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F. S. AlBuhairan, Z. A. Alemu, R. Alfonso, M. K. Ali, R. Ali, N. A. Guzman et al.** Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014, Bd. 384, 9945, S. 766-781.
7. **Herold, Gerd.** *Innere Medizin*. Köln : Gerd Herold Verlag, 2015. 978-3981466041.
8. **Kaplan, N. M.** The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Archives of internal medicine*. 1989, Bd. 149, 7, S. 1514-1520.
9. **M. Ng, T. Fleming, M. Robinson, B. Thomson, N. Graetz, C. Margono, E. C. Mullany, S. Biryukov, C. Abbafati, S. F. Abera, J. P. Abraham, N. M. Abu-Rmeileh, T. Achoki, F. S. AlBuhairan, Z. A. Alemu, R. Alfonso, M. K. Ali.** Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 384, 2014, 99445, S. 766-781.

10. **W.L. Xu, A.R. Atti, M. Gatz, N.L. Pederson, B. Johansson, L. Rratiglioni.** Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk: a population-based twin study. *Neurology*. 2011, Bd. 76, 18, S. 1568-1574.
11. **A. Singh-Manoux, S. Czernichow, A. Elbaz, A. Dugravot, S. Sabia, G. Hagger-Johnson, S. Kaffashian, M. Zins, E. J. Brunner, H. Nabi, M. Kivimäki.** Obesity phenotypes in midlife and cognition in early old age: the Whitehall II cohort study. *Neurology*. 2012, Bd. 79, 8, S. 755-762.
12. **K. Herrup, N. Rachael, S. L. Ackerman, A. Copani.** Divide and Die: Cell Cycle Events as Triggers of Nerve Cell Death. *The Journal of Neuroscience*. 2004, Bd. 24, 42, S. 9232-9239.
13. **M. A. Smith, C. A. Rotkamp, A. Nunomura, A. K. Raina, G. Perry.** Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2000, Bd. 1502, 1, S. 139-144.
14. **Endspurt Klinik Skript 13: Neurologie.** Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2013. 978-3-13-174441-8.
15. **Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin.** www.degam.de. [Online] 2008. [Zitat vom: 28. Juli 2016.] http://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-S3-Leitlinien/LL-12_Langfassung_TJ_03_korr_01.pdf. ISBN-13: 978-3-936572-16-2.
16. **S. Sütterlin, I. Hoßmann, R. Klingholz.** *Demenz-Report: wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können.* Berlin : Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung, 2011. 978-3-9812473-4-3.
17. **A. L. Houck, F. Hernández, J. Ávila.** A Simple Model to Study Tau Pathology. *Journal of experimental neuroscience*. 2016, Bd. 10, S. 31-38.
18. **K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal.** Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008, Bd. 12, 1, S. 38-55.
19. **G. Thinakaran, E. H. Koo.** Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *The Journal of biological chemistry*. 2008, Bd. 283, 44, S. 29615-29619.
20. **C. Haass, D. J. Selkoe.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007, Bd. 8, 2, S. 101-112.
21. **H. W. Querfurth, F. M. LaFerla.** Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 362, 2010, 4, S. 329-344.

22. **A. Kuhla, S. C. Ludwig, B. Kuhla, G. Münch, B. Vollmar.** Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of aging*. 36, 2015, 2, S. 753-761.
23. **H. Jiang, J. Jia.** Association between NR2B subunit gene (GRIN2B) promoter polymorphisms and sporadic Alzheimer's disease in the North Chinese population. *Neuroscience letters*. 2009, Bd. 450, 3, S. 356-360.
24. **Bickel, Horst.** Deutsche Alzheimer Gesellschaft e.V. Selbsthilfe Demenz. [Online] 2016. [Zitat vom: 15. Mai 2017.] https://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalzg.pdf.
25. **J. Viña, A. Lloret.** Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 20, 2010, 2, S. 527-533.
26. **H. J. Lüth, V. Ogunlade, B. Kuhla, R. Kientsch-Engel, P. Stahl, J. Webster, T. Arendt, G. Münch.** Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cerebral cortex*. 2005, Bd. 15, 2, S. 211-220.
27. **Y. M. Kuo, M. R. Emmerling, C. L. Bisgaier, A. D. Essenburg, H. C. Lampert, D. Drumm, A.E. Roher.** Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998, Bd. 252, 3, S. 711-715.
28. **L. M. Refolo, B. Malester, J. LaFrancois, T. Bryant-Thomas, R. Wang, G. S. Tint, K. Sambamurti, K. Duff, M. A. Pappolla.** Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of disease*. 2000, Bd. 7, 4, S. 321-331.
29. **L. M. Refolo, M. A. Pappolla, J. LaFrancois, B. Malester, S. D. Schmidt, T. Thomas-Bryant, G. S. Tint, R. Wang, M. Mercken, S. S. Petanceska, K. E. Duff.** A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2001, Bd. 8, 5, S. 890-899.
30. **J. Poirier, J. Miron, C. Picard, P. Gormley, L. Thérout, J. Breitner, D. Dea.** Apolipoprotein E and lipid homeostasis in the etiology and treatment of sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*. 2014, Bd. 35, 2, S. 3-10.
31. **H. Depypere, A. Vierin, S. Weyers, A. Sieben.** Alzheimer's disease, apolipoprotein E and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 94, 2016, S. 98-105.

32. **The Human Protein Atlas.** www.proteinatlas.org. [Online] 2016. [Zitat vom: 18. November 2016.] <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000130203-APOE/tissue>.
33. **A. C. Li, C. K. Glass.** The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Mature medicine*. 2002, Bd. 8, 11, S. 1235-1245.
34. **T. Yoshikawa, T. Ide, H. Shimano, N. Yahagi, M. Amemiya-Kudo, T. Matsuzaka, S. Yatoh, T. Kitamine, H. Okazaki, Y. Tamura, M. Sekiya, A. Takahashi, A. H. Hasty, R. Sato, H. Sone, J. Osuga, S. Ishibashi, N. Yamada.** Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. *Molecular endocrinology*. 2003, Bd. 17, 7, S. 1240-1254.
35. **Y. Song, M. J. Stampfer, S. Liu.** Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Annals of internal medicine*. 2004, Bd. 141, 2, S. 137-147.
36. **J. Kim, H. Yoon, J. Basak, J. Kim.** Apolipoprotein E in synaptic plasticity and Alzheimer's disease: potential cellular and molecular mechanisms. *Molecules and cells*. 2014, Bd. 37, 11, S. 767-776.
37. **J. Kim, J. M. Basak, D. M. Holtzman.** The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009, Bd. 63, 3, S. 287-303.
38. **M. K. Lupton, P. Proitsi, K. Lin, G. Hamilton, M. Daniilidou, M. Tsolaki, J. F. Powell.** The role of ABCA1 gene sequence variants on risk of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2014, Bd. 38, 4, S. 897-906.
39. **R. W. Mahley, Y. Huang.** Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology. *Neuron*. 2012, Bd. 76, 5, S. 871-885.
40. **E. Masliah, M. Mallory, N. Ge, M. Alford, I. Veinbergs, A. D. Roses.** Neurodegeneration in the central nervous system of apoE-deficient mice. *Experimental neurology*. 1995, Bd. 136, 2, S. 107-122.
41. **V. Zerbi, M. Wiesmann, T. L. Emmerzaal, D. Jansen, M. Van Beek, M. P. Mutsaers, C. F. Beckmann, A. Heerschap, A. J. Kiliaan.** Resting-state functional connectivity changes in aging apoE4 and apoE-KO mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 34, 2014, 42, S. 13963-13975.
42. **H. S. Hoe, J. Freeman, G. W. Rebeck.** Apolipoprotein E decreases tau kinases and phospho-tau levels in primary neurons. *Molecular neurodegeneration*. 2006, Bd. 1, 18.

43. **D. G. Hardie, F. A. Ross, S. A. Hawley.** AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 13, 2012, 4, S. 251-262.
44. **B. B. Kahn, T. Aliquier, D. Carling, D. G. Hardie.** AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism.* 1, 2005, 1, S. 15-25.
45. **A. Caccamo, V. De Pinto, A. Messina, C. Branca, S. Oddo.** Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society of Neuroscience.* 34, 2014, 23, S. 7988-7998.
46. **A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Haapasalo, H. Soininen, M. Hiltunen.** AMP-activated protein kinase: a potential player in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry.* 2011, Bd. 118, 4, S. 460-474.
47. **Z. Cai, L. J. Yan.** Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer's Disease. *Journal of Biochemical and Pharmacological Research.* 1, 2013, 2, S. 84-90.
48. **A. Kharitononkov, A. B. Shanafelt.** Fibroblast growth factor-21 as a therapeutic agent for metabolic diseases. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics and gene therapy.* 2008, Bd. 22, 1, S. 37-44.
49. **F. Zhang, L. Yu, X. Lin, P. Cheng, L. He, X. Li, X. Lu, Y. Tan, H. Yang, L. Cai, C. Zhang.** Minireview: Roles of Fibroblast Growth Factors 19 and 21 in Metabolic Regulation and Chronic Diseases. *Molecular endocrinology.* 29, 2015, 10, S. 1400-1413.
50. **V. Thorns, E. Masliah.** Evidence for neuroprotective effects of acidic fibroblast growth factor in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology.* 1999, Bd. 58, 3, S. 296-306.
51. **T. Nishimura, Y. Nakatake, M. Konishi, N. Itoh.** Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et biophysica acta.* 2000, Bd. 1492, 1, S. 203-206.
52. **A. Vilà-Brau, A. L. De Sousa-Coelho, C. Mayordomo, D. Haro, P. F. Marrero.** Human HMGCs2 regulates mitochondrial fatty acid oxidation and FGF21 expression in HepG2 cell line. *The Journal of biological chemistry.* 2011, Bd. 286, 23, S. 20423-20430.
53. **A. C. Adams, C. C. Cheng, T. Coskun, A. Kharitononkov.** FGF21 requires β klotho to act in vivo. *PloS one.* 2012, Bd. 7, 11, e49977.

54. J. Yie, W. Wang, L. Deng, L. T. Tam, J. Stevens, M. M. Chen, Y. Li, J. Xu, R. Lindberg, R. Hecht, M. Véniant, C. Chen, M. Wang. Understanding the physical interactions in the FGF21/FGFR/ β -Klotho complex: structural requirements and implications in FGF21 signaling. *Chemical biology & drug design*. 2012, Bd. 79, 4, S. 398-410.
55. A. Kharitonov, T.L. Shiyanova, A. Koester, A.M. Ford, R. Micanovic, E.J. Galbreath, G.E. Sandusky, L.J. Hammond, J.S. Moyers, R.A. Owens, J. Gromada, J.T. Brozinick, E.D. Hawkins, V.J. Wroblewski, D.S. Li, F. Mehrbod, S.R. Jaskunas, A.B. Shanafelt. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *The Journal of clinical investigation*. 2005, Bd. 115, 6, S. 1627-1635.
56. A. Kharitonov, V. J. Wroblewski, A. Koester, Y. F. Chen, C. K. Clutinger, X. T. Tigno, B. C. Hansen, A. B. Shanafelt, G. J. Etgen. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*. 2007, Bd. 148, 2, S. 774-781.
57. M. Giralt, A. Gavaldà-Navarro, F. Villarroya. Fibroblast growth factor-21, energy balance and obesity. *Molecular and cellular endocrinology*. 418, 2015, 1, S. 66-73.
58. H. T. Do, T. V. Tselykh, J. Mäkelä, T. H. Ho, V. M. Olkkonen, B. C. Bornhauser, L. Korhonen, N. Zelcer, D. Lindholm. Fibroblast growth factor-21 (FGF21) regulates low-density lipoprotein receptor (LDLR) levels in cells via the E3-ubiquitin ligase Mylip/Idol and the Canopy2 (Cnpy2)/Mylip-interacting saposin-like protein (Msap). *The Journal of biological chemistry*. 2012, Bd. 287, 16, S. 12602-12611.
59. W. Wente, A. M. Efanov, M. Brenner, A. Kharitonov, A. Köster, G. E. Sandusky, S. Sewing, I. Treinies, H. Zitzer, J. Gromada. Fibroblast growth factor-21 improves pancreatic beta-cell function and survival by activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt signaling pathways. *Diabetes*. 2006, Bd. 55, 9, S. 2470-2478.
60. A. Salminen, A. Kauppinen, K. Kaarniranta. FGF21 activates AMPK signaling: impact on metabolic regulation and the aging process. *Journal of molecular medicine*. 95, 2017, 2, S. 123-131.
61. M. D. Chau, J. Gao, Q. Yang, Z. Wu, J. Gromada. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, Bd. 107, 28, S. 12553-12558.
62. H. Hsueh, W. Pan, A. J. Kastin. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides*. 2007, Bd. 28, 12, S. 2382-2386.

63. **A. L. Bookout, M. H. de Groot, B. M. Owen, S. Lee, L. Gautron, H. L. Lawrence, X. Ding, J. K. Elmquist, J. S. Takahashi, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer.** FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nature medicine*. 19, 2013, 9, S. 1147-1152.
64. **M. K. Badman, P. Pissios, A. R. Kennedy, G. Koukos, J. S. Flier, E. Maratos-Flier.** Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell metabolism*. 2007, Bd. 5, 6, S. 426-437.
65. **A. Kuhla, S. Hahn, A. Butschkau, S. Lange, A. Wree, B. Vollmar.** Lifelong caloric restriction reprograms hepatic fat metabolism in mice. *The journal of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2014, Bd. 69, 8, S. 915-922.
66. **E. M. Domouzoglou, E. Maratos-Flier.** Fibroblast growth factor 21 is a metabolic regulator that plays a role in the adaptation to ketosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2011, Bd. 93, 4, S. 901-905.
67. **S. Sharma, P. Jain.** The ketogenic diet and other dietary treatments for refractory epilepsy in children. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2014, Bd. 17, 3, S. 253-258.
68. **A. Kuhla, S. Lange, C. Holzmann, F. Maass, J. Petersen, B. Vollmar, A. Wree.** Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. 8, 2013, 7, e68778.
69. **Y.H. Youm, K.Y. Nguyen, R.W. Grant, E.L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D'Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T.D. Kanneganti, S. Kang, T.L. Horvath, T.M. Fahmy, P.A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri, V.D. Dixit.** The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature medicine*. 2015, Bd. 21, 3, S. 263-269.
70. **V. I. Popov, L. S. Bocharova.** Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibres and hippocampal pyramidal neurons. *Neuroscience*. 1992, Bd. 48, 1, S. 53-62.
71. **T. Arendt, J. Stieler, A. M. Strijkstra, R. A. Hut, J. Rüdiger, E. A. Van der Zee, T. Harkany, M. Holzer, W. Härtig.** Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003, Bd. 23, 18, S. 6972-6981.
72. **B. T. Nelson, X. Ding, J. Boney-Montoya, R. D. Gerard, S. A. Kliewer, M. T. Andrews.** Metabolic hormone FGF21 is induced in ground squirrels during hibernation but its overexpression is not sufficient to cause torpor. *PloS One*. 2013, Bd. 8, 1, e53574.

73. **A. Savioz, G. Leuba, P. G. Vallet.** A framework to understand the variations of PSD-95 expression in brain aging and in Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*. 2014, 18, S. 86-94.
74. **M. H. Moghadasian, B. M. McManus, L. B. Nguyen, S. Shefer, M. Nadji, D. V. Godin, T. J. Green, J. Hill, Y. Yang, C. H. Scudamore, J. J. Frohlich.** Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 15, 2001, 14, S. 2623-2630.
75. **I. Genis, I. Gordon, E. Sehayek, D. M. Michaelson.** Phosphorylation of tau in apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience letters*. 199, 1995, 1, S. 5-8.
76. **I. Gordon, E. Grauer, I. Genis, E. Sehayek, D. M. Michaelson.** Memory deficits and cholinergic impairments in apolipoprotein E-deficient mice. *Neuroscience letters*. 199, 1995, 1, S. 1-4.
77. **A. E. Roher, C. Esh, A. Rahman, T. A. Kokjohn, T. G. Beach.** Atherosclerosis of cerebral arteries in Alzheimer disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 35, 2004, 11, S. 2623-2627.
78. **S. M. Greenberg, M. E. Gurol, J. Rosand, E. E. Smith.** Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 35, 2004, 11, S. 2616-2619.
79. **N. Herrmann, T. Harimoto, R. Balshaw, K. L. Lanctôt und Investigators, Canadian Outcomes Study in Dementia (COSID).** Risk Factors for Progression of Alzheimer Disease in a Canadian Population: The Canadian Outcomes Study in Dementia (COSID). *Canadian journal of psychiatry*. 60, 2015, 4, S. 189-199.
80. **D. Østergaard, S. Mukherjee, S. J. Sharp, P. Proitsi, L. A. Lotta, F. Day, J. R. Perry, K. L. Boehme, S. Walter, J. S. Kauwe, L. E. Gibbons et al.** Associations between Potentially Modifiable Risk Factors and Alzheimer Disease: A Mendelian Randomization Study. *PLoS medicine*. 12, 2015, 6, e1001841.
81. **G. Razay, A. Vreugdenhil, G. Wilcock.** The metabolic syndrome and Alzheimer disease. *Archives of neurology*. 64, 2007, 1, S. 93-96.
82. **K. G. Alberti, R. H. Eckel, S. M. Grundy, P. Z. Zimmet, J. I. Cleeman, K. A. Donato, J. C. Fruchart, W. P. James, C. M. Loria, S. C. Smith Jr et al.** Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 120, 2009, 16, S. 1640-1645.
83. **J. A. Ríos, P. Cisternas, M. Arrese, S. Barja, N. C. Inestrosa.** Is Alzheimer's disease related to metabolic syndrome? A Wnt signaling conundrum. *Progress in neurobiology*. 121, 2014, S. 125-46.

84. **L. Zhu, M. Zhong, G. A. Elder, M. Sano, D. M. Holtzman, S. Gandy, C. Cardozo, V. Haroutunian, N. K. Robakis, D. Cai.** Phospholipid dysregulation contributes to ApoE₄-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112, 2015, 38, S. 11965-11970.
85. **C. I. Janssen, D. Jansen, M. P. Mutsaers, P. J. Dederen, B. Geenen, M. T. Mulder, A. J. Kiliaan.** The Effect of a High-Fat Diet on Brain Plasticity, Inflammation and Cognition in Female ApoE₄-Knockin and ApoE-Knockout Mice. *PLoS One*. 11, 2016, 5, e0155307.
86. **H. Noyan, O. El-Mounayri, R. Isserlin, S. Arab, A. Momen, H. S. Cheng, J. Wu, T. Afroze, R. K. Li, J. E. Fish, G. D. Bader, M. Husain.** Cardioprotective Signature of Short-Term Caloric Restriction. *PLoS One*. 10, 2015, 6, e0130658.
87. **A. Soare, E. P. Weiss, P. Pozzilli.** Benefits of caloric restriction for cardiometabolic health, including type 2 diabetes mellitus risk. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 30, 2014, S1, S. 41-47.
88. **C. Van Cauwenberghe, C. Vandendriessche, C. Libert, R. E. Vandenbroucke.** Caloric restriction: beneficial effects on brain aging and Alzheimer's disease. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2016, doi: 10.1007/s00335-016-9647-6, S. 1-22.
89. **A. V. Witte, M. Fobker, R. Gellner, S. Knecht, A. Flöel.** Caloric restriction improves memory in elderly humans. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 106, 2009, 4, S. 1255-1260.
90. **J. Laczó, H. Markova, V. Lobellova, I. Gazova, M. Parizkova, J. Cerman, T. Nekovarova, K. Vales, S. Klovzova, J. Harrison, M. Windisch, K. Vlcek, J. Svoboda, J. Hort, A. Stuchlik.** Scopolamine disrupts place navigation in rats and humans: a translational validation of the Hidden Goal Task in the Morris water maze and a real maze for humans. *Psychopharmacology*. 2016, S. 1-13. DOI: 10.1007/s00213-016-4488-2.
91. **M. M. Adams, L. Shi, M. C. Linville, M. E. Forbes, A. B. Long, C. Bennett, I. G. Newton, C. S. Carter, W. E. Sonntag, D. R. Riddle, J. K. Brunso-Bechtold.** Caloric restriction and age affect synaptic proteins in hippocampal CA₃ and spatial learning ability. *Experimental neurology*. 211, 2008, 1, S. 141-149.
92. **M. Maalouf, J. M. Rho, M. P. Mattson.** The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. *Brain research reviews*. 59, 2009, 2, S. 293-315.

93. **M. S. Bele, K. A. Gajare, A. A. Deshmukh.** Caloric restriction mimetic 2-deoxyglucose maintains cytoarchitecture and reduces tau phosphorylation in primary culture of mouse hippocampal pyramidal neurons. *In vitro cellular & developmental biology.* 51, 2015, 6, S. 546-555.
94. **M. Rakhshandehroo, B. Knoch, M. Müller, S. Kersten.** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. *PPAR research.* 2010, 2010, pii: 612089. doi: 10.1155/2010/612089, S. 393-416.
95. **S. Mandrekar-Colucci, J. C. Karlo, G. E. Landreth.** Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2012, Bd. 32, 30, S. 10117-10128.
96. **L. F. Maia, S. A. Kaeser, J. Reichwald, M. Hruscha, P. Martus, M. Staufenbiel, M. Jucker.** Changes in amyloid- β and Tau in the cerebrospinal fluid of transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein. 5, 2013, 194.
97. **T. Inagaki, P. Dutchak, G. Zhao, X. Ding, L. Gautron, V. Parameswara, Y. Li, R. Goetz, M. Mohammadi, V. Esser, J. K. Elmquist, R. D. Gerard, S. C. Burgess, R. E. Hammer, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer.** Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell metabolism.* 5, 2007, 6, S. 415-425.
98. **R. Smith, A. Duguay, A. Bakker, P. Li, J. Weiszmann, M. R. Thomas, B. M. Alba, X. Wu, J. Gupte, L. Yang, J. Stevens, A. Hamburger, S. Smith, J. Chen, R. Komorowski, K. W. Moore, M. M. Véniant, Y. Li.** FGF21 can be mimicked in vitro and in vivo by a novel anti-FGFR1c/ β -Klotho bispecific protein. *PloS one.* 8, 2013, 4, e61432.
99. **P. A. Dutchak, T. Katafuchi, A. L. Bookout, J. H. Choi, R. T. Yu, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer.** Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell.* 2012, Bd. 148, 3, S. 556-567.
100. **B. M. Owen, D. J. Mangelsdorf, S. A. Kliewer.** Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends in endocrinology and metabolism.* 26, 1, S. 22-29.
101. **K. Li, L. Li, M. Yang, H. Liu, G. Boden, G. Yang.** The effects of fibroblast growth factor-21 knockdown and over-expression on its signaling pathway and glucose-lipid metabolism in vitro. *Molecular and cellular endocrinology.* 348, 2012, 1, S. 21-26.
102. **Y. Yu, J. He, S. Li, L. Song, X. Guo, W. Yao, D. Zou, X. Gao, Y. Liu, F. Bai, G. Ren, D. Li.** Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2

and suppressing the NF- κ B signaling pathway. *International immunopharmacology*. 38, 2016, S. 144-152.

103. **W. F. Wang, S. M. Li, G. P. Ren, W. Zheng, Y. J. Lu, Y. H. Yu, W. J. Xu, T. H. Li, L. H. Zhou, Y. Liu, D. S. Li.** Recombinant murine fibroblast growth factor 21 ameliorates obesity-related inflammation in monosodium glutamate-induced obesity rats. *Endocrine*. 49, 2015, 1, S. 119-129.

104. **L. A. Da Costa, P. Arora, B. García-Bailo, M. Karmali, A. El-Soheemy, A. Badawi.** The association between obesity, cardiometabolic disease biomarkers, and innate immunity-related inflammation in Canadian adults. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*. 5, 2012, S. 347-355.

105. **P. Sa-Nguanmoo, P. Tanajak, S. Kerdphoo, P. Satjaritanun, X. Wang, G. Liang, X. Li, C. Jiang, W. Pratchayasakul, N. Chattipakorn, S. C. Chattipakorn.** FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and behavior*. 85, 2016, S. 86-95.

106. **C. Rühlmann, T. Wölk, T. Blümel, L. Stahn, B. Vollmar, A. Kuhla.** Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. *Aging*. 8, 2016, 11, S. 2777-2789.

107. **F. M. Fisher, J. L. Estall, A. C. Adams, P. J. Antonellis, H. A. Bina, J. S. Flier, A. Kharitonov, B. M. Spiegelman, E. Maratos-Flier.** Integrated regulation of hepatic metabolism by fibroblast growth factor 21 (FGF21) in vivo. *Endocrinology*. 152, 2011, 8, S. 2996-3004.

108. **P. López-Cotarelo, C. Escribano-Díaz, I. L. González-Bethencourt, C. Gómez-Moreira, M. L. Deguiz, J. Torres-Bacete, L. Gómez-Cabañas, J. Fernández-Barrera, C. Delgado-Martín, M. Mellado, J. R. Regueiro, M. E. Miranda-Carús, J. L. Rodríguez-Fernández.** A novel MEK-ERK-AMPK signaling axis controls chemokine receptor CCR7-dependent survival in human mature dendritic cells. *The Journal of biological chemistry*. 290, 2015, 2, S. 827-840.

109. **L. Ma, W. Dong, R. Wang, Y. Li, B. Xu, J. Zhang, Z. Zhao, Y. Wang.** Effect of caloric restriction on the SIRT1/mTOR signaling pathways in senile mice. *Brain Research Bulletin*. 116, 2015, S. 67-72.

110. **W. Guo, L. Qian, J. Zhang, W. Zhang, A. Morrison, P. Hayes, S. Wilson, T. Chen, J. Zhao.** Sirt1 overexpression in neurons promotes neurite outgrowth and cell survival through inhibition of the mTOR signaling. *Journal of Neuroscience Research*. 89, 2011, 11, S. 1723-1736.

111. M. S. Oitzl, M. Mulder, P. J. Lucassen, L. M. Havekes, J. Grootendorst, E. R. de Kloet. Severe learning deficits in apolipoprotein E-knockout mice in a water maze task. *Brain research*. 1997, Bd. 752, 1-2, S. 189-196.

6.2 Thesen

- I. ApoE-Knockout-Mäuse bilden mit zunehmendem Alter neurodegenerative Prozesse aus, welche ähnlich einer Demenz (beziehungsweise des Morbus Alzheimer) sind.
- II. Eine langfristige Kalorienrestriktion führt in ApoE-Knockout-Mäusen zu einer Synthesesteigerung von hepatischem FGF21.
- III. Hepatisches FGF21 wird endokrin in die Blutbahn sezerniert und überwindet die Blut-Hirn-Schranke.
- IV. Zentralnervös aktiviert FGF21 den FGF-Rezeptor 1c.
- V. FGFR1c sowie eine hohe AMP/ATP-Ratio durch vermindertes Nahrungsangebot führen zu einer Phosphorylierung von AMPK.
- VI. pAMPK kann mTOR inhibieren.
- VII. Durch die Hemmung von mTOR wird weniger pTau und vermehrt PSD-95 gebildet.
- VIII. Zusammenfassend ergibt sich folgende Kaskade: $\text{FGF21} \rightarrow \text{pFGFR1c} \rightarrow \text{pAMPK} \rightarrow \text{mTOR} \rightarrow \text{pTau} \downarrow + \text{PSD-95} \uparrow$
- IX. Weiterhin zeigen ApoE-Knockout-Mäuse nach 65-wöchiger Kalorienrestriktion im Morris Water Maze ein besseres räumliches Gedächtnis im Vergleich zu gleichaltrigen ad libitum gefütterten Mäusen.
- X. Möglicherweise besitzt also eine CR mit FGF21 als Schlüsselprotein das Potential einer neurodegenerativen Erkrankung entgegen zu wirken.

6.5 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Univ.-Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar für die Ermöglichung der Promotion und die hilfreichen Ratschläge bei der Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. rer. nat. Angela Kuhla sowohl für die Vergabe des Promotionsthemas als auch für die sehr gute Zusammenarbeit während der Durchführung der Studie und der Fertigstellung der Arbeit danken, da sie mich bei jeglichen Problemen jederzeit konstruktiv unterstützt hat.

Außerdem danke ich Berit Blendow, Dorothea Frenz, Maren Nerowski und Eva Lorbeer-Rehfeldt für die Unterstützung bei den Expressionsanalysen und histologischen Schnitten.

Ferner möchte ich Ilona Klamfuß, Karin Gerber und Mareike Degner aufgrund der maßgeblichen Hilfe bei der Tierhaltung der Versuchsmäuse sowie den monatlichen Blutentnahmen danken.

Darüber hinaus bin ich Claire Rühlmann für die Zusammenarbeit bei den Versuchen und die Arbeit am Research Paper sehr dankbar.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen und Analysen im Rahmen ihrer Bachelorarbeit danke ich ebenso Laura Stahn.

Weiterhin danke ich allen, die direkt oder indirekt bei der Bearbeitung der Dissertation geholfen und zur Fertigstellung beigetragen haben sowie nicht zuletzt meiner Familie und meinen Freunden.